



周冉,王兴平,虎喜敏,李宇航,王正兴,罗仍卓么. circFAM53B在奶牛乳腺上皮细胞炎症反应中的作用[J]. 中国农业大学学报,2025,30(03):37-48.
ZHOU Ran, WANG Xingping, HU Ximin, LI Yuhang, WANG Zhengxing, LUORENG Zhuoma. Role of circFAM53B in the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(03): 37-48.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.03.04

circFAM53B在奶牛乳腺上皮细胞炎症反应中的作用

周冉 王兴平 虎喜敏 李宇航 王正兴 罗仍卓么*

(宁夏大学 动物科技学院,银川 750021)

摘要 为探究 circFAM53B 在奶牛乳房炎中的功能,以牛乳腺上皮细胞(bMECs)为研究对象,采用生物信息学对 circFAM53B 的功能进行预测,然后在 LPS 诱导的 bMECs 炎症中干扰或过表达 circFAM53B 检测其对细胞炎症、增殖和凋亡的影响。结果表明:1)奶牛 circFAM53B 为真实存在的环状 RNA,主要定位于 bMECs 细胞质中。2)在 LPS 诱导 bMECs 炎症反应中, circFAM53B 的表达水平极显著上调($P<0.01$)。3)在 bMECs 炎症反应中,奶牛 circFAM53B 可促进炎症因子的表达和分泌,抑制细胞活力和增殖,促进细胞凋亡,加剧炎症的发展。综上, circFAM53B 可能参与奶牛乳房炎的调控,促进炎症进程。本研究为奶牛乳房炎抗病分子育种奠定基础。

关键词 环状 circRNA; 奶牛; 乳房炎; 乳腺上皮细胞; 大肠杆菌

中图分类号 S831

文章编号 1007-4333(2025)03-0037-12

文献标志码 A

Role of circFAM53B in the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells

ZHOU Ran, WANG Xingping, HU Ximin, LI Yuhang, WANG Zhengxing,

LUORENG Zhuoma*

(College of Animal Science and Technology, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract To investigate the function of circFAM53B in dairy cow mastitis, this study took bovine mammary epithelial cells (bMECs) as the research object, and bioinformatics was used to predict the function of circFAM53B. The effects of circFAM53B on cell inflammation, proliferation and apoptosis were examined by interfering or overexpressing circFAM53B in LPS-induced bMECs inflammation. The results showed that: 1) Dairy cow circFAM53B was a real-existing circular RNA, mainly located in the cytoplasm of bMECs. 2) The expression level of dairy cow circFAM53B was highly significantly up-regulated in LPS-induced inflammatory response of bMECs ($P<0.01$). 3) In the inflammatory response of bMECs, circFAM53B in cows can promote the expression and secretion of inflammatory factors, inhibits cell viability and proliferation, and promote apoptosis in bMECs inflammation, and exacerbate the development of inflammation. In conclusion, circFAM53B may be involved in the regulation of cow mastitis and promote the inflammatory process. This study lays a foundation for molecular breeding for resistance to cow mastitis.

Keywords circular RNA; dairy cow; mastitis; mammary epithelial cells; *E. coli*

乳房炎发病率高、治疗成本昂贵且会导致牛奶污染,给牧场造成巨大的经济损失^[1],同时给奶业的

健康、可持续发展带来重要挑战^[2]。引起奶牛乳房炎的原因复杂,奶牛乳房受到物理、化学和微生物

收稿日期: 2024-05-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060749);宁夏自然科学基金项目(2023AAC03049);国家现代农业产业技术体系项目(CARS-36)

第一作者: 周冉(ORCID:0009-0003-1820-5821),硕士研究生,E-mail:zhouan18243320047@163.com

通讯作者: 罗仍卓么(ORCID:0000-0003-2737-4785),副教授,主要从事奶牛基因表达调控与分子育种相关研究;E-mail:luorenzhuoma@nxu.edu.cn

刺激均可能引起炎症,但是奶牛个体的遗传因素对乳房炎的易感性和抗病性也至关重要^[3]。乳房炎的发生和发展过程受多个基因的调节,但其具体的分子调控机制不完全清晰^[4]。奶牛乳腺上皮细胞(Bovine mammary gland epithelial cells, bMECs)是奶牛乳腺免疫功能的基础细胞,可以帮助乳房抵抗病原微生物侵染。大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为引起乳房炎的主要病原菌之一,其表面的毒力因子脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)通过激活bMECs内的Toll样受体^[5]、核因子 κ B(Nuclear factor kappa-B, NF- κ B)^[6]和丝裂原活化蛋白激酶^[7]等炎症相关信号通路促进促炎因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的表达^[8],加剧乳房炎的严重程度。因此,常用LPS诱导bMECs构建细胞炎症模型,探究*E. coli*型奶牛乳房炎的分子调控机制。

circRNA是一种由mRNA前体经过反向剪接产生的非编码RNA。高通量测序技术的迅速发展导致circRNA相关研究爆炸式增长^[9],越来越多的研究表明circRNA在基因表达调控^[10]、细胞功能调节^[11]、疾病发生^[12]等方面发挥着重要作用,就奶牛乳房炎而言,学者们筛选了多个差异表达的circRNA, Bai等^[13]选取健康荷斯坦奶牛和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*)自然感染的患乳房炎荷斯坦奶牛的乳腺上皮组织,筛选得到19个差异表达的circRNA,其中显著差异表达的circRNA2860、circRNA5323和circRNA4027可能直接或间接地在奶牛乳房炎中起作用,这为circRNA参与奶牛乳房炎调控的潜在分子机制提供了新的见解。另外, Wang等^[14]构建了奶牛乳房炎体外模型,在LPS处理的bMECs中发现了71个不同炎症阶段的差异表达circRNA,功能分析显示这些差异表达circRNA可能通过调节众多相关信号通路参与细胞增殖、凋亡和炎症反应。但是在这些差异表达circRNA中,仅有少数的circRNA进行了功能研究,例如circ05280^[15]、circ08409^[16]和circIL27RA^[17]等。

circFAM53B是新发现的在奶牛乳房炎中差异表达的circRNA,但在奶牛乳房炎中的功能尚不清楚。本研究初次鉴定了circFAM53B的环状特性,并进行了circFAM53B在LPS诱导bMECs产生炎症反应中的作用研究,以期补充奶牛乳房炎分子调控网络,并为奶牛抗乳房炎分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞

本试验采用的bMECs是经本研究团队鉴定^[18]的乳腺上皮细胞系(MAC-T)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DMEM-高糖培养基购于Hyclone;胎牛血清(FBS)购于BI;荧光定量试剂盒;反转录试剂盒和TRIzol购于TAKARA;Ribonuclease R购于Epicentre;LipofectamineTM 3000购于Invitrogen;CCK-8检测试剂盒、细胞增殖检测试剂盒和细胞凋亡检测试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司;IL-6、IL-8和IL-1 β 对应的ELISA试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司;PARIS核质分离试剂盒购于Life Technologies;pCD25-ciR(GFP)载体购于广州吉赛生物科技有限公司;circFAM53B干扰片段购于生工生物工程(上海)股份有限公司。多功能酶标仪、普通PCR仪、电泳凝胶成像仪和CFX96 Touch荧光定量PCR仪均为Bio-Rad公司产品;荧光倒置显微镜购于OLYMPUS。

1.2 试验方法

1.2.1 circFAM53B生物信息学分析

根据碱基序列互补原则,采用MobaXterm服务器分析预测circFAM53B可能靶向的miRNA;采用TargetScan和miRWalk在线工具预测潜在靶向miRNA的靶基因;通过欧易集团云平台中的在线工具进行靶基因的KEGG信号通路富集分析。

1.2.2 bMECs体外培养及LPS诱导bMECs炎症

将bMECs解冻后,使用含10%胎牛血清的DMEM-高糖培养基,在37℃、5%CO₂浓度和100%饱和湿度的条件下,培养于细胞培养板中。将生长状态良好的bMECs接种于6孔板中进行培养。细胞融合度达到70%~80%后,每孔加终浓度为50 ng/ μ L的LPS诱导bMECs,收集未经处理和LPS处理6 h的bMECs,提取细胞总RNA,用于逆转录cDNA。

1.2.3 核质分离与RNA提取

参照PARIS细胞核质分离试剂盒说明书中的操作步骤,分离bMECs的细胞核和细胞质RNA;Trizol法提取bMECs的总RNA。使用多功能酶标仪检测RNA的浓度与纯度。

1.2.4 circFAM53B 的克隆、成环鉴定及亚细胞定位

为证实 circFAM53B 及其成环接口的真实存在,首先以上一步骤提取的总 RNA 逆转录成 cDNA 为模板,使用扩增 circFAM53B 全长的引物和跨 circFAM53B 剪接位点的发散引物通过 PCR 扩增目的片段,完成扩增后进行 PCR 产物纯化回收,将回收产物连接到 pMD™ 19-T 载体上送至杨凌奥科生物技术有限公司进行 Sanger 测序。

为证明 circFAM53B 的环状特性,使用 Ribonuclease R 试剂盒进行 RNA 线性消化试验。将准备的总 RNA 分成等量的 2 组,一组做 RNase R 线性消化,另外一组加等量无酶水做阴性对照,

RNase R 线性消化反应条件为:消化 37 ℃ 15 min,灭活 85 ℃ 10 min。将 2 组处理后的 RNA 分别取 1 000 ng 逆转录成 cDNA,以 β -actin 作为内参,使用 circFAM53B 的发散引物进行普通 PCR 扩增。另外,分别以 bMECs 的 gDNA 和总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,使用发散引物和收敛引物通过 PCR 扩增目的片段,利用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。上述扩增引物信息见表 1,扩增的反应体系为 2×Taq Master Mix 10 μ L,上下游引物各 0.8 μ L,模板 1.5 μ L,无酶水 6.9 μ L;反应条件为:预变性 95 ℃ 5 min,变性 95 ℃ 15 s,退火 15 s 和延伸(时间按照扩增产物 1 000 bp/min 计算),重复 39 个循环,最终延伸 72 ℃ 5 min,4 ℃ 保存。

表 1 PCR 扩增引物信息
Table 1 Information of amplification primers of PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	产物大小/bp Product length	退火温度/℃ Annealing temperature
circFAM53B	F: GTGCCCCCTTCAGATCGACC R: TTCCTGTCCAGGTCTCGCCA	779	63
发散引物 Divergent primer	F: CAAGAAGGTGGGCATCAAGC R: GCCGAAGCCGTTGGAGTAA	435	60
收敛引物 Convergent primer	F: CTCCAACGGCTTCGGCACCA R: CGCCGCTTGATGCCACCTT	383	65
GAPDH	F: GGCATCGTGGAGGGACTTATG R: GCCAGTGAGCTTCCCGTTGAG	186	60
U6	F: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT R: CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT	89	60
β -actin	F: CAAGGACCTCTACGCCAACA R: ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	197	60

将 1.2.3 中得到的 bMECs 核、质 RNA 分别取 1 000 ng 进行逆转录,以 GAPDH 和 U6 为内参,使用 circFAM53B 的发散引物进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳,随后通过 ImageJ 软件分析目的条带的灰度值粗略估计 circFAM53B 在 bMECs 细胞核和细胞质中的表达情况,引物信息见表 1,反应条件与体系同上述。

1.2.5 circFAM53B 的过表达和干扰

本试验根据 pCD25-ciR(GFP)载体说明书合成带有酶切位点 *EcoR* I 和 *Bam* H I 以及环化介导序列的 circFAM53B 片段,经双酶切和纯化回收后,与 pCD25-ciR 载体连接,通过重组载体筛选等步骤获

得 pCD25-circFAM53B 过表达重组载体。根据 circFAM53B 的序列委托生工生物工程(上海)股份有限公司针对跨剪接位点设计并合成了 3 条特异性 circFAM53B-siRNA 序列和 1 条非特异性 siRNA-NC。

待细胞融合度达到 70% 左右时根据 Lipofectamine™ 3000 试剂说明书进行转染,每个转染组设置 3 个重复,circFAM53B-siRNA 以及阴性对照组 siRNA-NC 的工作浓度为 50 nmol/L, pCD25-circFAM53B 过表达载体以及 pCD25-ciR 空载的工作浓度为 1.5 ng/ μ L。加样后摇匀放入恒温培养箱,42 h 后加入 50 ng/ μ L LPS 诱导细胞产生

炎症,在LPS诱导6 h后收集细胞,提取总RNA用于后续试验。

1.2.6 引物设计和qRT-PCR分析

根据circFAM53B序列以及GeneBank公布的相关基因的mRNA序列,采用Primer5.0软件设计了circFAM53B、细胞炎症相关基因(*IL-6*、*IL-8*和*IL-1β*)、增殖相关基因(*CDK2*、*CDK4*和*PCNA*)、凋亡相关基因(*CASP3*、*CASP9*和*BCL2*)及内参基因(*GAPDH*和

RPS18),引物如表2所示。引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成,超纯水溶解、备用。qRT-PCR的反应体系:2×TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10 μL,上、下游引物各0.8 μL(表2),cDNA模板100 ng,加无菌无酶的ddH₂O至20 μL。qRT-PCR的反应条件:95℃预变性30 s,然后95℃5 s,60℃30 s,40个循环。采用2^{-ΔΔCt}方法,以*GAPDH*和*RPS18*为双内参基因计算目的基因的相对表达量。

表2 qRT-PCR引物序列
Table 2 Sequences of qRT-PCR primers

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	产物大小/bp Product length	GeneBank 登录号 GeneID
circFAM53B	F: AGGAGGCACAGGAGCAGA R: CGTTGTGGTCACTGAGGCT	230	/
<i>IL-6</i>	F: CACTCCATTCGCTGTCT R: GTGTCTCCTTGCTGCTT	227	280826
<i>IL-8</i>	F: ACACATTCCACACCTTTCCAC R: ACCTTCTGCACCCACTTTTC	149	280828
<i>IL-1β</i>	F: CAACCGTACCTGAACCC R: GACACCACCTGCCTGAA	110	281251
<i>CASP3</i>	F: AAGATTTAGTGCCGATGC R: GACCACCAAGTTCTAGGATA	175	408016
<i>CASP9</i>	F: CCTGCCTTACCATTACCC R: GCATTCTGCTCCTCCTCC	205	100140945
<i>BCL2</i>	F: GATGACCGAGTACCTGAACCG R: GACAGCCAGGAGAAATCAAACA	120	281020
<i>CDK2</i>	F: GATGGACGGAGCTTGTTATCG R: ATCACACTCACACTGGAGAAGA	182	519217
<i>CDK4</i>	F: CCTTCATGCCAACTGCATCG R: CCAGAGTGTAACAACCACAGGT	168	510618
<i>PCNA</i>	F: GAACCTCACCAGCATGTCCA R: ACGTGTCGCGTTATCTTCA	86	515499
<i>GAPDH</i>	F: GGCATCGTGGAGGGACTTATG R: CCAGTGAGCTTCCCGTTGAG	186	281181
<i>RPS18</i>	F: GTGGTGTTGAGGAAAGCAGACA R: TGATCACACGTTCCACCTCATC	79	326602

1.2.7 ELISA检测细胞促炎因子分泌

采用1.2.5的方法转染pCD25-circFAM53B、pCD25-ciR、si-circFAM53B或siRNA-NC至bMECs中并使用LPS进行诱导,收集细胞培养基,用离心机在1 000 r/min和4℃条件下离心5 min后,去除细胞碎片并收集上清液,根据制造商的说明,使用相应的ELISA试剂盒在450 nm检测样品的OD值,计算

bMECs培养上清液中细胞因子IL-1β、IL-6和IL-8的分泌水平。

1.2.8 细胞活力和增殖检测

本试验为探究circFAM53B对LPS诱导的bMECs的增殖情况的影响,采用EdU法检测细胞增殖能力。待接种于24孔细胞培养板的bMECs融合至60%~70%时,分别转染pCD25-circFAM53B、pCD25-ciR、si-

circFAM53B或siRNA-NC,并在42 h后加终浓度为50 ng/ μ L的LPS进行诱导炎症,6 h后按照EdU检测试剂盒说明书上的操作步骤对增殖细胞和所有细胞核进行染色,使用荧光倒置显微镜进行荧光拍照。

为探究circFAM53B对LPS诱导的bMECs的活力影响,采用CCK-8法检测细胞活力。将bMECs接种培养于96孔板中,待细胞融合至60%~70%时,分别转染pCD25-circFAM53B、pCD25-ciR、si-circFAM53B或siRNA-NC,并在42 h后加终浓度为50 ng/ μ L的LPS进行诱导炎症,5 h后加10 μ L CCK-8增强型溶液,1 h后检测450 nm吸收光,计算细胞存活率。

1.2.9 Annexin V-FITC/PI染色法检测细胞凋亡

将bMECs接种培养于24孔细胞培养板中,待细胞融合至60%~70%时,分别转染pCD25-circFAM53B、pCD25-ciR、si-circFAM53B或siRNA-NC,并在42 h后加终浓度为50 ng/ μ L的LPS进行诱导炎症,6 h后进行Annexin V-FITC和PI染色,荧光倒置显微镜下进行荧光检测。

1.3 统计分析

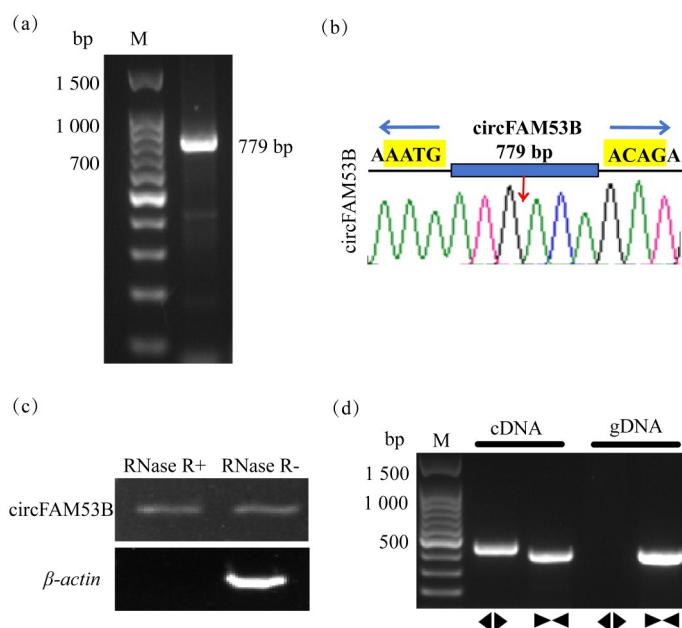
所有进行统计检验的试验均重复3次,数据以

平均数均值 $\pm$ 标准误差表示,使用GraphPad Prism 8.3.0软件中的 t -test进行差异显著性分析。以 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 奶牛 circFAM53B 的鉴定及其亚细胞定位

经PCR产物测序得到全长为779 bp的奶牛circFAM53B(图1(a)),证明该circRNA真实存在。为鉴定circFAM53B是环状RNA,对扩增所得跨剪接位点序列的Sanger测序结果进行分析,结果显示,circFAM53B具有反向剪接产生的环化位点(图1(b))。RNase R线性消化试验表明circFAM53B具有较强的消化抗性(图1(c)),进一步说明circFAM53B为环状RNA。以cDNA为模板可以扩增得到circFAM53B及其对应的线性RNA,但gDNA为模板只能扩增得到对应的线性DNA(图1(d)),说明circFAM53B为环状RNA,而非来自基因组的环状DNA。亚细胞定位试验显示,circFAM53B在细胞核和细胞质中均有分布,但主要分布在细胞质中(图2),推测其具有通过海绵吸附miRNA发挥调控作用的功能。

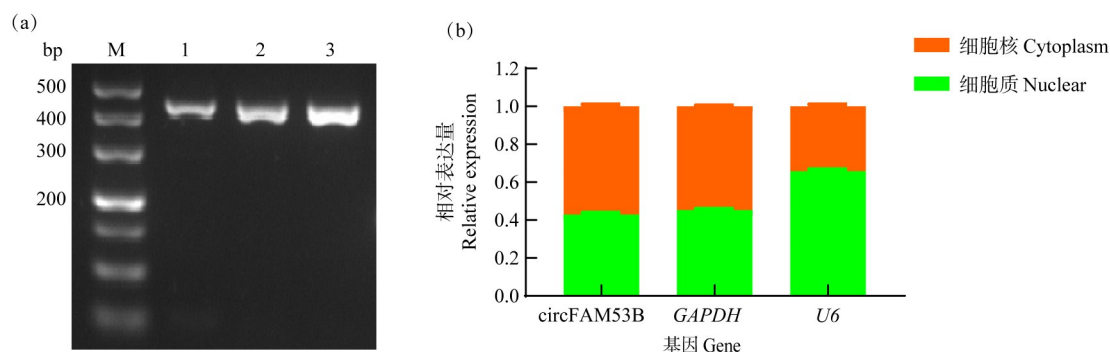


(a) 奶牛 circFAM53B 的克隆;(b) 奶牛 circFAM53B 跨剪接位点;(c) RNase R 消化试验;(d) 奶牛 circFAM53B 环状验证,◀▶:发散引物;▶▶:收敛引物。

(a) Cloning of cloning of dairy cow circFAM53B;(b) Splicing site of dairy cow circFAM53B;(c) RNase R digestion assay;(d) Circular validation of dairy cow circFAM53B, ◀▶:Divergent primer; ▶▶:Convergent primer.

图1 奶牛 circFAM53B 的环状特性鉴定

Fig. 1 Identification of circular characteristics of circFAM53B in dairy cow



(a) M, DL500 DNA Marker; 1, 细胞核扩增片段; 2, 细胞质扩增片段; 3, 全细胞扩增片段; (b) 扩增片段的半定量分析。

(a) M, DL500 DNA Marker; 1, Amplified fragments in nucleus; 2, Amplified fragments in cytoplasm; 3, Amplified fragment in whole cells; (b) Semi quantitative analysis of amplified fragments.

图2 奶牛 circFAM53B 的核质定位

Fig. 2 Nucleoplasmic localization of circFAM53B in dairy cow

2.2 奶牛 circFAM53B 的生物信息学分析

为探究 circFAM53B 的生物学功能,本研究采用生物信息学方法预测其潜在靶向 miRNA 及靶基因,结果显示, circFAM53B 的潜在靶向 miRNA 包括 bta-miR-145、bta-miR-193a-5p、bta-miR-139 和 bta-miR-375。bta-miR-139 的潜在靶基因有 *LMO4*、*NR5A2* 和 *CCDC50* 等 43 个; bta-miR-193a-5p 有 *SGSM1*、*MYO1D* 和 *LAMP5* 等 29 个潜在的靶基因; bta-miR-145 的潜在靶基因有 *HTR2A*、*PAX3* 和 *PAPD5* 等 101 个; bta-miR-375 有 *PLXDC2*、*EGR3* 和 *PTGFR* 等 175 个潜在靶基因。这些靶基因的功能富集分析结果表明 circFAM53B 可能与 miRNA 结合,从而调控其靶基因并参与到炎症相关的信号通路(图 3),最终在炎症性免疫疾病中发挥调控功能。

2.3 circFAM53B 在 bMECs 炎症反应中的表达

体外培养 bMECs,用 LPS 处理细胞 6 h 后采用 qRT-PCR 和 ELISA 检测促炎细胞因子 IL-6、IL-8 和 IL-1 β 的表达水平。结果表明,相比于对照组,在 LPS 诱导组中 IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达水平极显著上调 ($P < 0.01$), IL-8 的 mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.05$) (图 4(a))。同时, LPS 诱导组中 IL-8 和 IL-1 β 的蛋白分泌量显著增加 ($P < 0.05$), IL-6 的蛋白分泌量呈上调趋势(图 4(b))。结果表明,本研究利用 LPS 成功诱导了 bMECs 炎症模型,可用于后续试验。

采用 qRT-PCR 检测 circFAM53B 在上述 bMECs 炎症模型中的表达水平。结果表明,相较于对照组,在 LPS 诱导的 bMECs 中 circFAM53B 极显

著上调 ($P < 0.01$) (图 4(c)),提示 circFAM53B 可能在 LPS 导致的 bMECs 炎症中发挥作用。

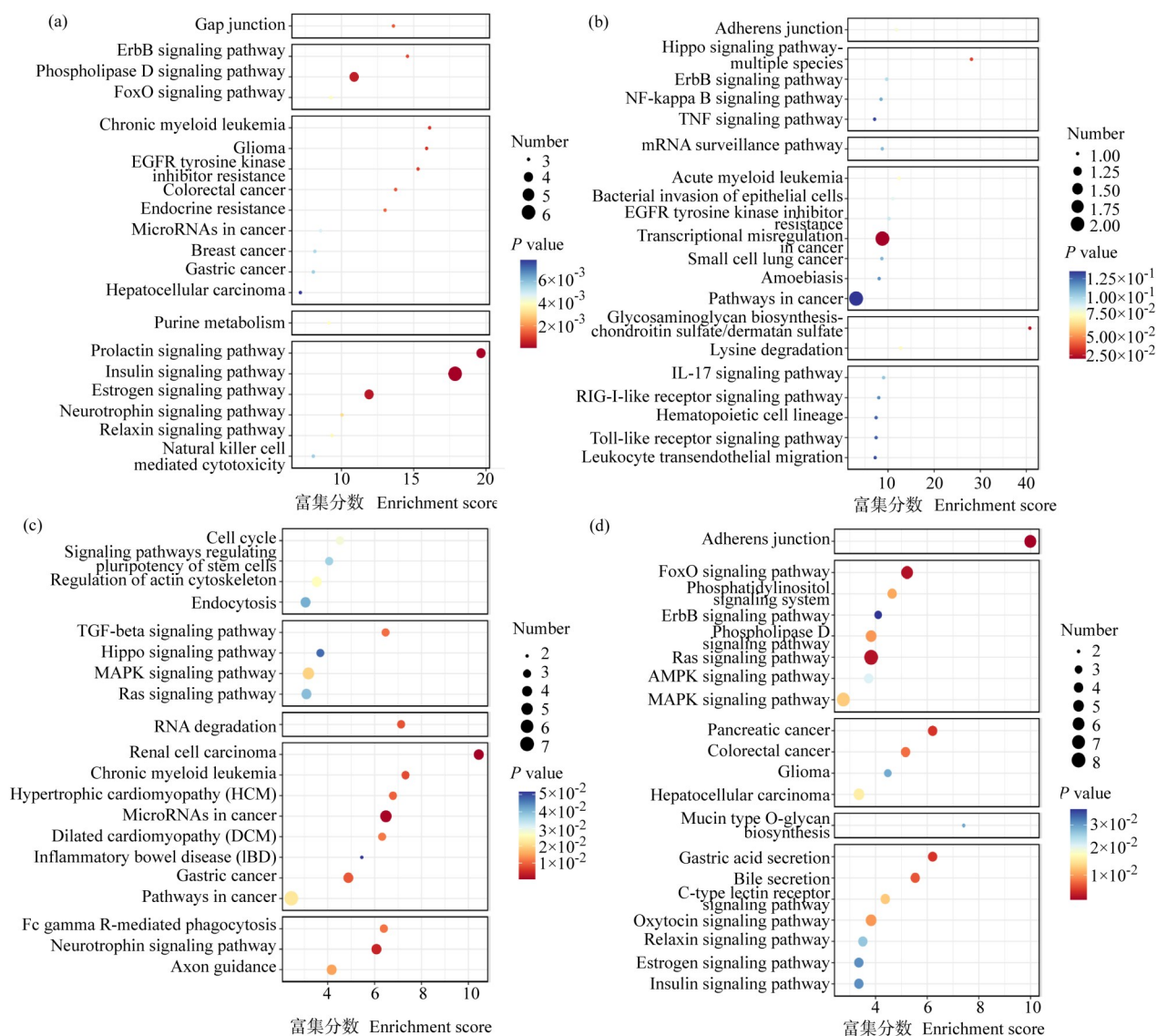
2.4 circFAM53B 干扰片段筛选和过表达效率检测

为筛选干扰效率最佳的干扰片段,将体外合成的 3 条特异性 siRNA 或 siRNA-NC 转染至 bMECs 中,48 h 后通过 qRT-PCR 检测 circFAM53B 的表达。结果表明,与 siRNA-NC 组相比,3 条 siRNA 均显著下调 ($P < 0.05$),其中 siRNA-3 的抑制效率最高(图 5(a))。因此,将 siRNA-3 命名为 si-circFAM53B 并进行后续的抑制试验。

构建 pCD25-circFAM53B 过表达载体后,对重组载体进行 *EcoR I* 和 *BamH I* 双酶切鉴定,结果显示,酶切后产生 2 条带(图 5(b)),目标条带的大小与 circFAM53B 大小一致,说明载体 pCD25-ciR 与 circFAM53B 成功连接。将空载体 pCD25-ciR 和过表达载体 pCD25-circFAM53B 分别转染到 bMECs 中,检测 circFAM53B 的表达量,结果表明,与 pCD25-ciR 组相比, pCD25-circFAM53B 组中 circFAM53B 的表达水平显著上调了 6.546 倍 ($P < 0.05$) (图 5(c)),其过表达的细胞可用于后续试验开展。

2.5 circFAM53B 对 LPS 诱导的 bMECs 炎症反应的影响

为了探究 circFAM53B 对 LPS 诱导的 bMECs 中促炎因子表达的影响,向 bMECs 中转染 si-circFAM53B 和 pCD25-circFAM53B 以及其对应的阴性对照,并进行 LPS 炎症诱导。随后,采用 qRT-PCR 和 ELISA 检测促炎细胞因子 IL-6、IL-8 和 IL-1 β 在 mRNA 和分泌

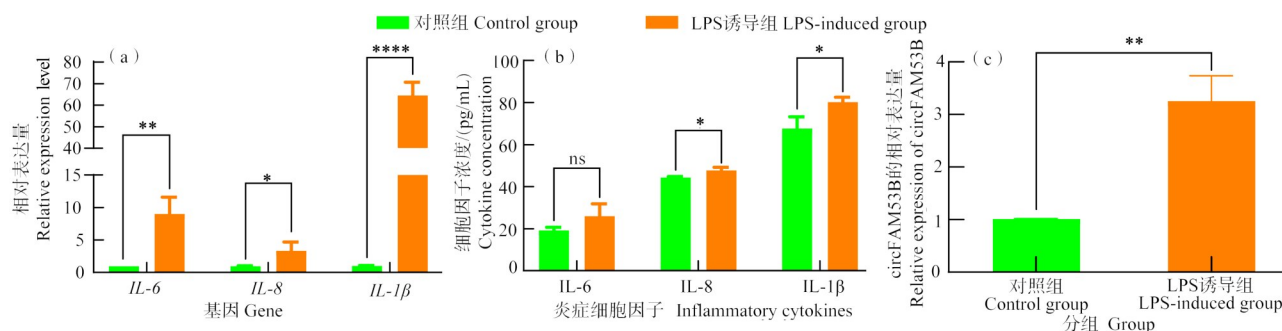


(a) bta-miR-139 功能注释预测; (b) bta-miR-193a-5p 功能注释预测; (c) bta-miR-145 功能注释预测; (d) bta-miR-375 功能注释预测。

(a) Functional annotation prediction of bta-miR-139; (b) Functional annotation prediction of bta-miR-193a-5p; (c) Functional annotation prediction of bta-miR-145; (d) Functional annotation prediction of bta-miR-375.

图3 奶牛 circFAM53B 的 KEGG 功能注释分析

Fig. 3 KEGG functional annotation analysis for dairy cow circFAM53B

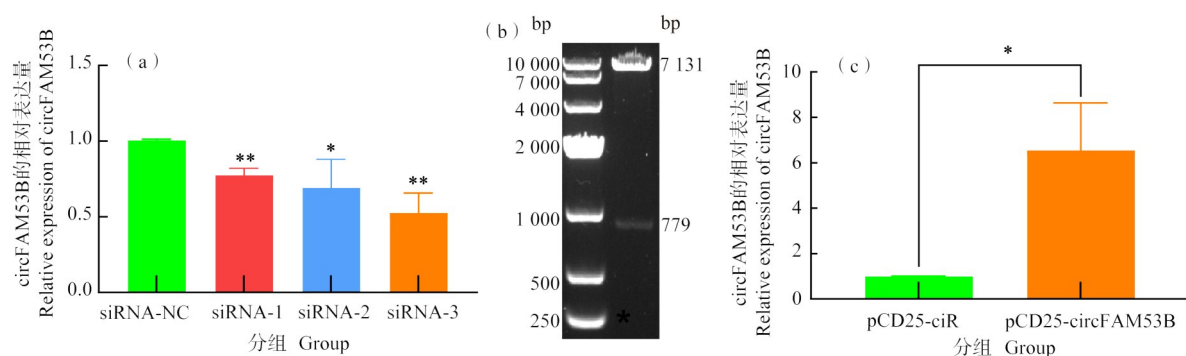


*表示差异显著 ($0.01 < P < 0.05$), **, ***, ****表示差异极显著 ($P < 0.01$), ns表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下同。(a) LPS 诱导 bMECs 后促炎细胞因子的基因表达; (b) LPS 诱导 bMECs 后促炎细胞因子的蛋白表达; (c) circFAM53B 在 LPS 诱导的 bMECs 中的表达。

* indicated significant differences ($0.01 < P < 0.05$), **, *** and **** indicated extremely significant differences ($P < 0.01$), ns indicated that the difference was not significant ($P > 0.05$). The same below. (a) Gene expression of pro-inflammatory cytokines in bMECs induced by LPS; (b) Protein expression of pro-inflammatory cytokines in bMECs induced by LPS; (c) Expression of circFAM53B in bMECs induced by LPS.

图4 circFAM53B在bMECs炎症反应中的表达

Fig. 4 Expression of circFAM53B in bMECs inflammatory response



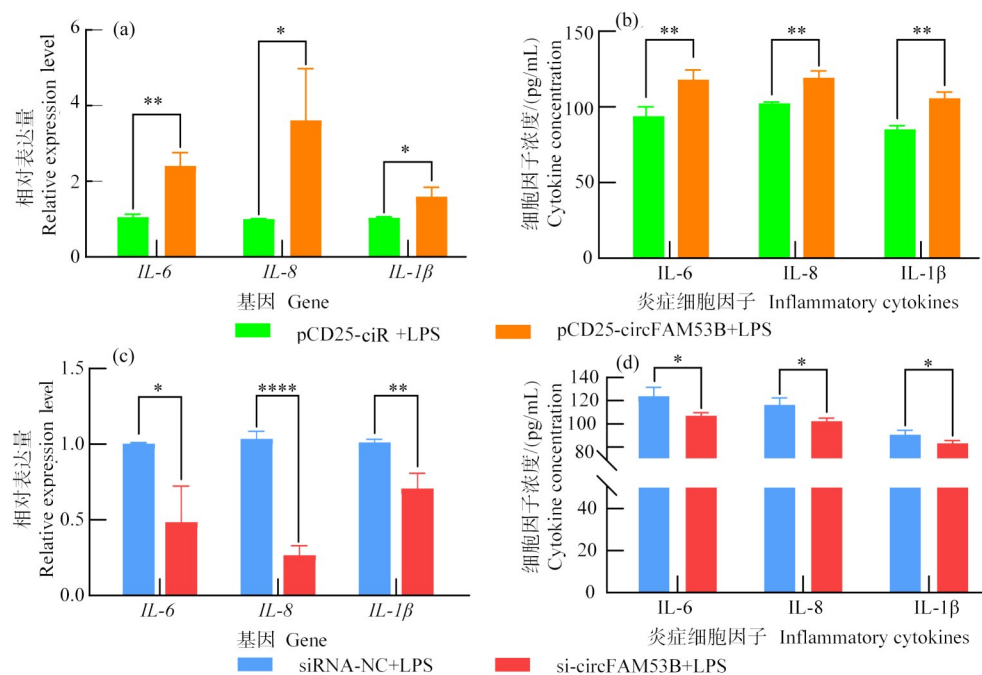
(a) circFAM53B干扰片段筛选;(b) circFAM53B过表达载体双酶切鉴定;(c) circFAM53B过表达效率。
(a) Screening of circFAM53B interference fragments;(b) Double digestion identification of circFAM53B overexpression vectors;(c) Efficiency of circFAM53B overexpression.

图5 circFAM53B的干扰片段筛选和过表达效率检测

Fig. 5 Interference fragment screening and overexpression efficiency detection of circFAM53B

蛋白水平的表达量。结果显示,对 circFAM53B 的过表达上调了 *IL-6*、*IL-8* 和 *IL-1 β* 的 mRNA 表达(图 6(a)),并促进了 *IL-6*、*IL-8* 和 *IL-1 β* 的分泌水平(图 6

(b))。然而,干扰 circFAM53B 得到了相反的结果(图 6(c)和(d))。上述结果表明 circFAM53B 能够促进 LPS 诱导的 bMECs 炎症反应。



(a) circFAM53B 过表达对主要促炎因子基因表达的影响;(b) circFAM53B 过表达对主要促炎因子分泌的影响;(c) circFAM53B 抑制对主要促炎因子基因表达的影响;(d) circFAM53B 抑制对主要促炎因子分泌的影响。

(a) The effect of circFAM53B overexpression on the expression of key pro-inflammatory cytokine genes;(b) The effect of circFAM53B overexpression on the secretion of key pro-inflammatory factors;(c) The effect of circFAM53B inhibition on the expression of key pro-inflammatory cytokine genes;(d) The effect of circFAM53B inhibition on the secretion of key pro-inflammatory factors.

图6 circFAM53B对促炎因子表达和分泌的影响

Fig. 6 Effects of circFAM53B on expression and secretion for pro-inflammatory factors

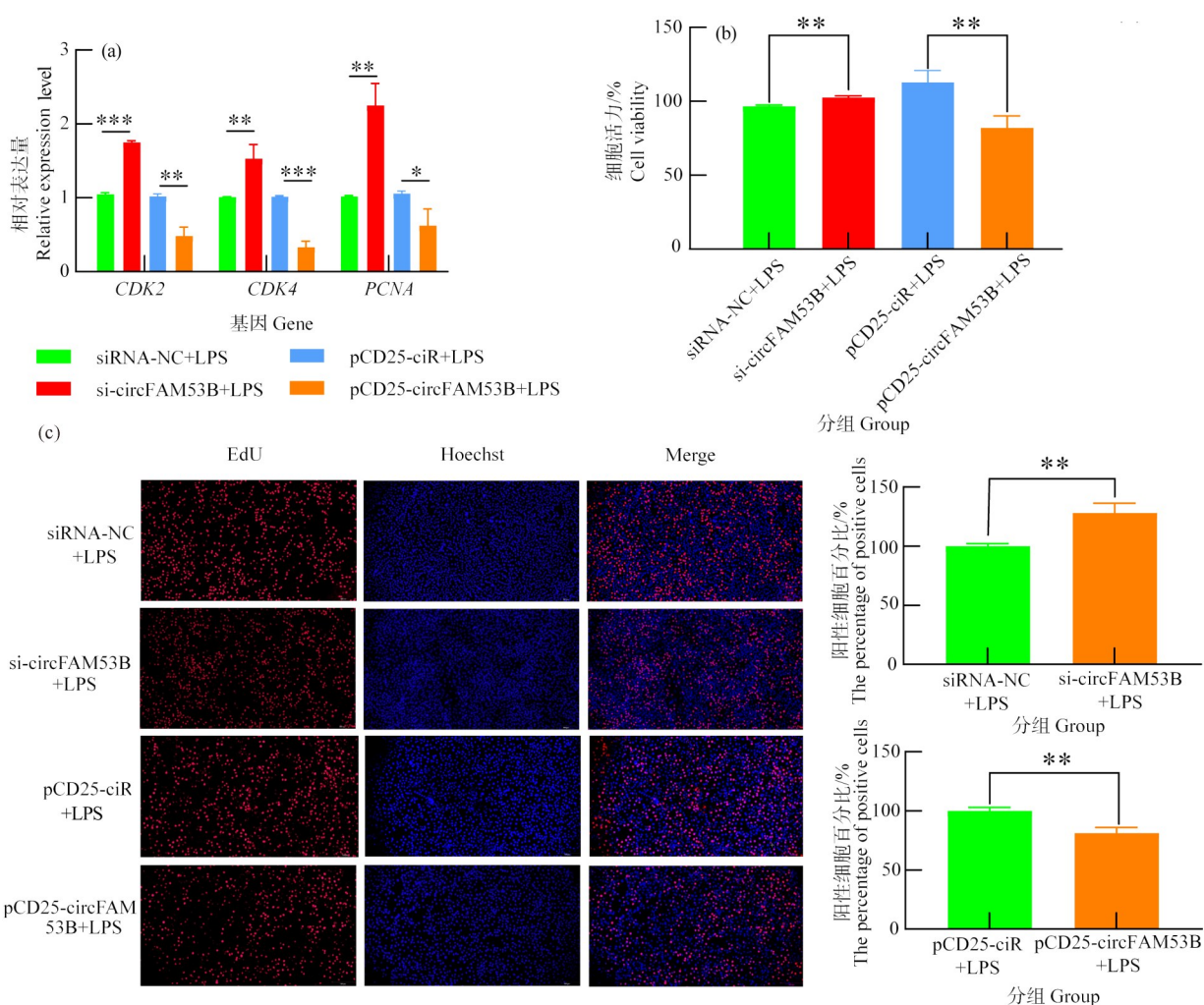
2.6 circFAM53B对LPS诱导的bMECs增殖能力的影响

为了检测 circFAM53B 对 LPS 诱导的 bMECs 增

殖能力和活力的影响,本试验采用 LPS 诱导 bMECs,同时过表达和抑制 circFAM53B,利用 qRT-PCR 检测增殖相关基因 *CDK2*、*CDK4* 和 *PCNA* 的表达水平;

采用CCK-8和EdU检测细胞活力和细胞增殖情况。结果显示,与pCD25-ciR组相比,pCD25-circFAM53B组中增殖相关基因 *CDK2* 和 *CDK4* 表达水平极显著下调($P<0.01$), *PCNA* 表达水平显著下调($P<0.05$) (图7(a));CCK-8检测结果显示,过表达 circFAM53B 可以极显著抑制细胞活力 ($P<0.01$),但干扰

circFAM53B后具有与过表达 circFAM53B 相反的结果 (图7(b));EdU 检测结果显示,相比于空载组 (pCD25-ciR),转染 pCD25-circFAM53B 组极显著抑制细胞增殖能力 ($P<0.01$) (图7(c))。上述结果说明 circFAM53B 对 LPS 诱导的 bMECs 增殖能力和活力均有明显的抑制作用。



(a) circFAM53B 对 bMECs 增殖相关基因 mRNA 表达的影响; (b) CCK-8 检测细胞活力; (c) EdU 检测细胞增殖情况。

(a) Effect of circFAM53B on mRNA expression of proliferation-related genes in bMECs; (b) Cell viability was detected by CCK-8; (c) Cell proliferation was detected by EdU.

图7 circFAM53B 对 LPS 诱导的 bMECs 增殖能力的影响

Fig. 7 Effect of circFAM53B on proliferative capacity of LPS-induced bMECs

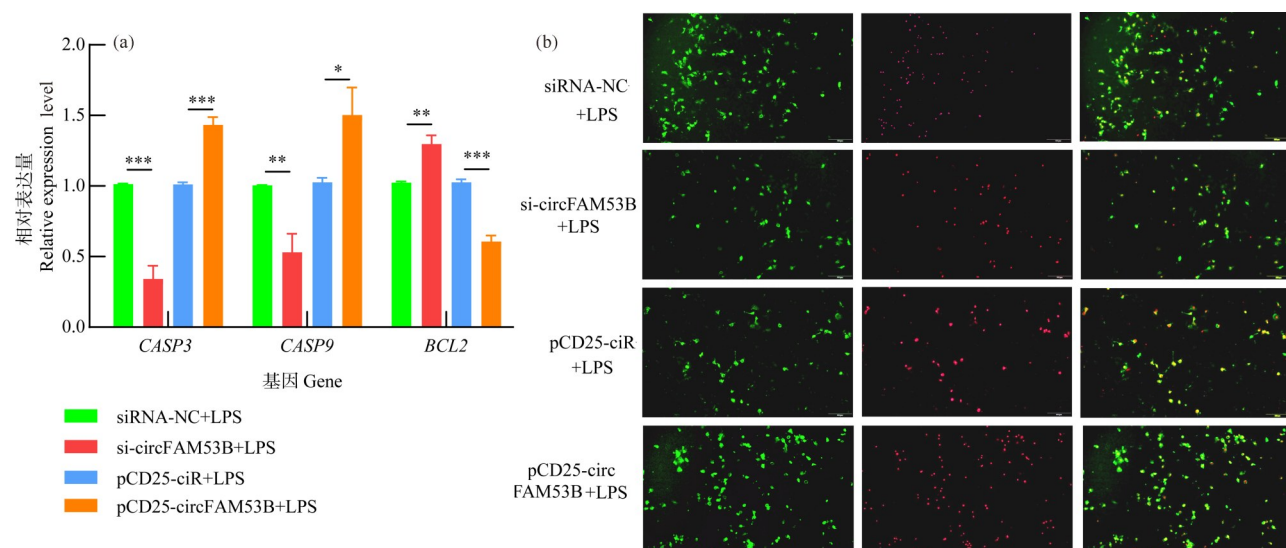
2.7 circFAM53B 对 LPS 诱导的 bMECs 凋亡的影响

为探究 circFAM53B 对 LPS 诱导的 bMECs 凋亡情况的影响,本研究在 bMECs 中过表达和干扰 circFAM53B 并进行 LPS 诱导,采用 qRT-PCR 检测凋亡相关基因表达量。结果显示,与对照组相比, pCD25-circFAM53B 处理组中促凋亡基因 *CASP3*

极显著上调 ($P<0.01$), *CASP9* 显著上调 ($P<0.05$), 抑凋亡基因 *BCL2* 极显著下调 ($P<0.01$), 转染 si-circFAM53B 后具有相反的效果 (图8 (a))。此外,采用 Annexin V-FITC/PI 染色法检测干扰或过表达 circFAM53B 并 LPS 处理后 bMECs 的凋亡情况。结果表明,与转染 pCD25-ciR 相比, 转染 pCD25-circFAM53B 后凋亡坏死的 bMECs 明

显增多,而与转染 siRNA-NC 相比,转染 si-circFAM53B 后凋亡坏死的 bMECs 明显减少(图

8(b))。上述结果表明 circFAM53B 会进一步促进 LPS 诱导 bMECs 的凋亡。



(a) circFAM53B 影响 bMECs 中凋亡相关基因的 mRNA 表达; (b) Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡情况。

(a) Effect of circFAM53B on mRNA expression of apoptosis-related genes in bMECs; (b) Annexin V-FITC/PI staining to detect cell apoptosis.

图 8 circFAM53B 对 LPS 诱导的 bMECs 凋亡的影响

Fig. 8 Effect of circFAM53B on apoptosis of LPS-induced bMECs

3 讨论

越来越多的 circRNA 被发现通过靶向 miRNA 在多种生物学过程中发挥重要作用^[10-12],在炎症性疾病中, circRNA001372 通过大鼠脑和神经细胞中的 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路抑制丙泊酚诱导的神经炎症,而 miRNA-148b-3p 拮抗 circRNA001372 的这种作用^[19]。 circNup188 可能通过海绵化 miR-760-3p 上调 MAP3K8 的表达,进而激活 NF- κ B 通路,从而参与脑缺血炎症的发展^[20]。 Zhang 等^[21]研究表明, circRSF1 通过动脉粥样硬化中 miR-135b-5p/HDAC1 通路调控 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞增殖、凋亡和炎症。另外在模式动物小鼠中, Zhou 等^[22]发现 circRNA3386 在内侧半月板失稳术诱导的小鼠骨关节炎中通过结合 miR-127-5p 来促进 MMP-13 的表达,参与调控 IL- β 诱导的软骨细胞增殖与凋亡。 circRNA 同样通过上述机制参与奶牛乳房炎的调控,如在重金属铅和镉引起的 bMECs 炎症中, circ05280 和 circ08409 分别通过 miR-146a/IRAK1 与 miR-133a/PTX3 路径调控炎症进展^[15-16]。但在奶牛乳房炎中并未发现 circFAM53B 可以作为 miRNA 的内源性竞争 RNA 发挥调控作用。本研究对 circFAM53B 进行潜在互作 miRNA 及其靶基因的预测并进行 KEGG 富集分析,结果显示

circFAM53B 可能通过 miR-193a-5p、miR-139、miR-145 和 miR-375 参与炎症相关信号通路调节,进而影响奶牛乳房炎的进程。 miR-193a-5p 可被 circOSBPL2 和 BRD4 竞争性结合调控慢性阻塞性肺疾病中的炎症反应^[23]。值得注意的是, miR-145 和 miR-375 均有在奶牛乳房炎中发挥作用的相关报道。 miR-145 通过靶向 PAXN 或 FSCN1 抑制 *S. aureus* 型 bMECs 炎症^[24]。 胡启超^[25]研究发现, miR-375 负调控 YBX1 的表达,显著升高促凋亡因子 BAD 及炎症因子 IL-6 和 IL-8 的表达量,促进 LPS 诱导的 bMECs 炎症。由此推测 circFAM53B 可能通过靶向 miR-193a-5p、miR-139、miR-145 或 miR-375 影响下游靶基因的表达,从而调节靶基因富集的炎症相关信号通路,在奶牛乳腺上皮细胞炎症中发挥调控作用。

在奶牛乳房炎中除了 circRNA 的转录组分析以外,也有少数差异表达 circRNA 进行了奶牛乳房炎的分子机制探究。周福振^[17]研究发现,在 100 ng/mL LPS 处理 6 h 构建的 bMECs 炎症模型中, circIL27RA 不仅能够正向调控其来源基因 IL27RA,而且过表达 circIL27RA 与 IL27RA 均能激活 NF- κ B 信号通路,促进炎症因子 IL-6 和 IL-8 的表达。本研究同样使用 LPS 处理 bMECs 6 h 诱导炎症,虽然使用 LPS 终浓度为 50 ng/mL,但显著上

调的促炎细胞因子表达量表明细胞炎症成功产生。Chen等^[16]发现在金属镉的诱导下, circ08409高表达且通过靶向 miR-133a 促进了炎症因子 *PTX3* 和先天免疫相关因子 *PGRP* 的表达水平。与此同时, 研究发现无论在小鼠乳腺组织还是 bMECs 中, 铅暴露均能通过 circ05280/miR-146a/*IRAK1* 通路促进乳房炎症^[15]。虽然迄今为止尚未见 circFAM53B 在奶牛乳房炎上的报道, 但其作为肿瘤调节因子, 可以通过内源性竞争 RNA 网络加速神经胶质瘤^[26] 和卵巢癌^[27] 的进展。另外, Huang等^[28] 通过整合来自乳腺癌样本的质谱和核糖体测序数据, 鉴定到 circFAM53B 可以编码免疫原性隐秘肽, 并证明了其具有抗肿瘤免疫原性。由此可知在动物体内 circFAM53B 可调控病理过程, 其中包括乳腺病变。

为了探究在奶牛乳房炎中 circFAM53B 发挥的作用, 本研究在 LPS 诱导炎症的 bMECs 中抑制和过表达 circFAM53B 后检测其对细胞炎症、凋亡和增殖情况的影响, 结果发现, circFAM53B 会导致炎症因子释放, 可能加剧奶牛乳房的炎症趋势。BCL2 是一种抗凋亡蛋白, 可以通过控制线粒体细胞色素 c 的释放来抑制细胞凋亡^[29]。研究表明, circ-JA760602 通过抑制 *BCL2* 促进缺氧诱导的细胞凋亡^[30], 同时 circFADS2 被证明在脓毒症中表达不足, 通过下调 *CASP3* 和 *CASP9* 的表达保护肺细胞免受 LPS 诱导的细胞凋亡^[31]。本研究中发现 LPS 诱导的 bMECs 中 circFAM53B 明显促进细胞凋亡, 因此推测 circFAM53B 在奶牛乳房炎中加速细胞凋亡从而加剧炎症损伤。

4 结 论

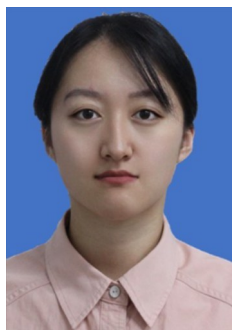
奶牛 circFAM53B 在 LPS 诱导炎症的 bMECs 中表达上调, 可能通过抑制细胞增殖、促进细胞炎症和凋亡加剧奶牛乳房炎的发展。

参考文献 References

- [1] Borş A, Borş S I, Floristean V C. Mastitis impact on high-yielding dairy farm's reproduction and net present value [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 1345782
- [2] Chen J, Hu X X, Li G H, Wan P M, Shao Z Y, Jin E G, Liu X H, Yang Q, Long A Y, Qian Y G. Investigation of *Prototheca bovis* infection and its correlation with dairy herd improvement data from a dairy farm in Central China [J]. *Veterinary Sciences*, 2024, 11(1): 37
- [3] Brand B, Hartmann A, Repsilber D, Griesbeck-Zilch B, Wellnitz O, Kühn C, Ponsuksili S, Meyer H H D, Schwerin M. Comparative expression profiling of *E. coli* and *S. aureus* inoculated primary mammary gland cells sampled from cows with different genetic predispositions for somatic cell score [J]. *Genetics, Selection, Evolution*, 2011, 43(1): 24
- [4] Bakhtiarzadeh M R, Mirzaei S, Norouzi M, Sheybani N, Sadi M S V. Identification of gene modules and hub genes involved in mastitis development using a systems biology approach [J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 722
- [5] Triantafyllou M, Triantafyllou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster [J]. *Trends in Immunology*, 2002, 23(6): 301-304
- [6] Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- κ B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling [J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md)*, 2003, 171(8): 4304-4310
- [7] Choi Y H, Kim B S, Kang S S. Genomic DNA extracted from *Lactiplantibacillus plantarum* attenuates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) -induced inflammatory responses via suppression of Toll-like receptor (TLR) -mediated mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathways [J]. *Food Science of Animal Resources*, 2023, 43(5): 938-947
- [8] Jiao B, Zhang W C, Zhang C X, Zhang K W, Cao X Q, Yu S C, Zhang X W. Protein tyrosine phosphatase 1B contributes to neuropathic pain by aggravating NF- κ B and glial cells activation-mediated neuroinflammation via promoting endoplasmic reticulum stress [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2024, 30(2): e14609
- [9] Xie X Q, Li K, Liang X T, Tian L, Lin B C, Yan J, Shi Y, Liu X H, Xi Z G. Identification and characterization of circular RNA in the model of autism spectrum disorder from PM_{2.5} exposure [J]. *Frontiers in Genetics*, 2023, 14: 970465
- [10] Li M, Pang X, Xu H, Xiao L. CircSCMH1 accelerates sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by regulating HNF1 expression via miR-485-5p [J]. *Molecular Biotechnology*, 2024
- [11] Wang N X, Yang B, Jin J, He Y, Wu X J, Yang Y C, Zhou W J, He Z X. Circular RNA circ_0040823 inhibits the proliferation of acute myeloid leukemia cells and induces apoptosis by regulating miR-516b/PTEN [J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2022, 24(3): e3404
- [12] Zhang Y P, Xie J. Ferroptosis-related exosomal non-coding RNAs: Promising targets in pathogenesis and treatment of non-malignant diseases [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2024, 12: 1344060
- [13] Bai Z X, Wu Y Z, Cai W D, Zheng Y Y, Hui T Y, Yue C, Sun J M, Wang Y R, Xu Z G, Wang Z Y. High-throughput analysis of circRNA in cows with naturally infected *Staphylococcus aureus* mammary gland [J]. *Animal Biotechnology*, 2023, 34(9): 4236-4246
- [14] Wang J P, Yang J, Jiao P, Ren Q Q, Luoreng Z M, Wang X P, Ma Y, Wei D W. Differential expression of circRNAs related to lipopolysaccharide-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells [J]. *Research in Veterinary Science*, 2022, 146: 24-27
- [15] Chen Z, Lu Q Y, Cao X, Wang K, Wang Y H, Wu Y N, Yang Z P. Lead exposure promotes the inflammation via the circRNA-05280/miR-146a/*IRAK1* axis in mammary gland [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 247: 114204
- [16] Chen Z, Liang Y Q, Lu Q, Nazar M, Mao Y J, Aboragah A, Yang Z P, Looor J J. Cadmium promotes apoptosis and inflammation via the circ08409/miR-133a/TGFB2 axis in bovine mammary epithelial cells and mouse mammary gland [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,

- 2021, 222: 112477
- [17] 周福振. 环状RNA IL27RA在LPS诱导奶牛乳腺炎中的表达及作用机制[D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- Zhou F Z. Expression and mechanism of circRNA IL27RA in mastitis of dairy cows induced by LPS[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023 (in Chinese)
- [18] Jiao P, Wang J P, Yang J, Wang X P, Luoreng Z M. Bta-miR-223 targeting the RHOB gene in dairy cows attenuates LPS-induced inflammatory responses in mammary epithelial cells[J]. *Cells*, 2022, 11 (19): 3144
- [19] Wang M Y, Suo L Y, Yang S, Zhang W Q. CircRNA 001372 reduces inflammation in propofol-induced neuroinflammation and neural apoptosis through PIK3CA/Akt/NF- κ B by miRNA-148b-3p [J]. *Journal of Investigative Surgery*, 2021, 34(11): 1167-1177
- [20] Zhang H, Deng J, Huang K L, He Y B, Cai Z L, He Y T. circNup188/miR-760-3p/Map3k8 axis regulates inflammation in cerebral ischemia[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2022, 64: 101830
- [21] Zhang X H, Lu J Y, Zhang Q H, Luo Q, Liu B. CircRNA RSF1 regulated ox-LDL induced vascular endothelial cells proliferation, apoptosis and inflammation through modulating miR-135b-5p/HDAC1 axis in atherosclerosis[J]. *Biological Research*, 2021, 54(1): 11
- [22] Zhou Z B, Huang G X, Fu Q, Han B, Lu J J, Chen A M, Zhu L. circRNA. 33186 contributes to the pathogenesis of osteoarthritis by sponging miR-127-5p[J]. *Molecular Therapy*, 2019, 27(3): 531-541
- [23] Zheng C F, Zhang Y P, Zhao Y C, Duan Y F, Mu Q H, Wang X Y. Circ-OSBPL2 contributes to smoke-related chronic obstructive pulmonary disease by targeting miR-193a-5p/BRD4 axis [J]. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2021, 16: 919-931
- [24] 赵俭. miR-145靶向PXN调控奶牛乳腺炎发病分子机制初探[D]. 新乡: 河南科技学院, 2019
- Zhao J. Study of the molecular mechanisms of miR-145 targeting PXN in the regulation of dairy cow mastitis pathogenesis[D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2019 (in Chinese)
- [25] 胡启超. miR-375在奶牛乳腺上皮细胞炎症反应中的作用研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2021
- Hu Q C. Study on the role of miR-375 in the inflammatory response of mammary epithelial cells in dairy cows [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2021 (in Chinese)
- [26] Pei J P, Dou H, Deng X Z. CircFAM53B promotes the proliferation and metastasis of glioma through activating the c-MET/PI3K/AKT pathway via sponging miR-532-3p[J]. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 2022, 21 (5): 462-476
- [27] Sun D, Liu J N, Zhou L L. Upregulation of circular RNA circ-FAM53B predicts adverse prognosis and accelerates the progression of ovarian cancer via the miR-646/VAMP2 and miR-647/MDM2 signaling pathways [J]. *Oncology Reports*, 2019, 42(6): 2728-2737
- [28] Huang D, Zhu X F, Ye S Y, Zhang J H, Liao J Y, Zhang N, Zeng X, Wang J W, Yang B, Zhang Y, Lao L Y, Chen J N, Xin M, Nie Y, Saw P E, Su S C, Song E W. Tumour circular RNAs elicit anti-tumour immunity by encoding cryptic peptides [J]. *Nature*, 2024, 625 (7995): 593-602
- [29] Yuan Z, Dewson G, Czabotar P E, Birkinshaw R W. VDAC2 and the BCL-2 family of proteins[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2021, 49 (6): 2787-2795
- [30] Li C, Wang J, Feng J, Zhou G, Jiang Y, Luo C, Cheng Z, Li J. Circ-JA760602 promotes the apoptosis of hypoxia-induced cardiomyocytes by transcriptionally suppressing BCL2 [J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2023, 67(1): 9-17
- [31] Niu F, Liang X F, Ni J D, Xia Z Y, Jiang L J, Wang H, Liu H J, Shen G F, Li X. CircRNA circFADS2 is under-expressed in sepsis and protects lung cells from LPS-induced apoptosis by downregulating miR-133a[J]. *Journal of Inflammation*, 2022, 19(1): 4

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 周冉,女,吉林延边人,宁夏大学在读硕士研究生,主要从事非编码RNA在奶牛乳房炎中的分子机制研究。以第一作者发表中文核心论文1篇。参与国家自然科学基金项目1项。



通讯作者简介: 罗仍卓么,博士,副教授,硕士生导师。现为宁夏大学畜牧学科骨干教师,国家奶牛产业技术体系岗位团队成员,“宁夏优势特色牛产业科技创新团队”和“反刍动物分子细胞育种”自治区级重点实验室骨干成员。近年来,一直主要从事奶牛基因表达调控与分子育种方面的教学与科研工作。正在主持国家自然科学基金项目1项;主持完成了国家自然科学基金项目、宁夏重点科技计划(引才专项)、宁夏自然科学基金项目、宁夏高等学校科研项目和湖南省教育厅科技计划项目各1项,发表论文40篇,其中以第一作者和通讯作者发表SCI论文20余篇(其中:中科院1区1篇;中科院2区12篇,TOP期刊3篇,中科院3区2篇);参编专著1部。