DOI:10.16016/j.1000-5404.202010070

环状 RNA circVCAN 对胎盘滋养细胞增殖、侵袭及自噬的影响

袁小岚,刘 丽,张 嫘,唐代钰,杨 童,董晓静 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科

[摘要] **目的** 探讨环状 RNA circVCAN(hsa-circ-0073239)在胎儿生长受限(fetal growth restriction,FGR)胎盘组织中的表达、功能及潜在作用机制。**方法** 收集重庆医科大学附属第二医院妇产科 2018 年 1 月~2018 年 12 月收治的 12 例 FGR 及 12 例正常孕妇的胎盘组织标本,采用实时荧光定量 PCR 检测胎盘组织中 circVCAN 的表达,培养人胎盘滋养细胞系 HTR8/Svneo,用 circVCAN 干扰及过表达质粒分别转染 HTR8/Svneo 细胞,采用 EdU、流式细胞仪、Transwell 实验检测细胞增殖、凋亡、侵袭能力的变化,用蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、ATG5、ATG7 的表达情况。**结果** circVCAN、ATG5、ATG7 及 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ在 FGR 胎盘组织中的表达均较正常组显著增高($P<0.05$)。FGR 组孕妇终止妊娠孕周较正常妊娠组早($P<0.05$),FGR 胎儿出生体质量、胎盘质量显著轻于正常妊娠组($P<0.01$,$P<0.05$),FGR 胎儿出生身长明显短于正常胎儿($P<0.01$)。沉默 circVCAN 后 HTR8/Svneo 细胞增殖、侵袭能力增强($P<0.01$),过表达 circVCAN 后 HTR8/Svneo 细胞增殖、侵袭能力减弱($P<0.01$),凋亡差异均无统计学意义($P>0.05$)。沉默 circVCAN 的 HTR8/Svneo 细胞 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、ATG5、ATG7 表达均降低($P<0.05$),过表达 circVCAN 的 HTR8/Svneo 细胞 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、ATG5、ATG7 表达均升高($P<0.05$)。**结论** circVCAN 在 FGR 胎盘组织中呈高表达,circVCAN 对凋亡无影响,但可抑制胎盘滋养细胞的增殖、侵袭,可能通过促进 ATG5、ATG7 的表达而增强自噬。

[关键词] circVCAN; FGR; HTR8/SVneo 滋养细胞;增殖;侵袭;自噬
[中图法分类号] R394.1;R714.5;R715.5 [文献标志码] A

Effects of circular RNA circVCAN on proliferation, invasion and autophagy of placental trophoblast cells

YUAN Xiaolan, LIU Li, ZHANG Lei, TANG Daiyu, YANG Tong, DONG Xiaojing Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression, function and potential mechanism of circular RNA circVCAN (also known as hsa-circ-0073239) in fetal growth restriction (FGR) placenta. **Methods** The placenta tissue samples were collected from 24 pregnant women (12 with FGR and 12 normal pregnancy) admitted in our hospital from January to December 2018. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to detect the expression of circVCAN in these placenta samples. Human placental trophoblast cell line HTR8/SVneo was cultured and then transfected with circVCAN interference and overexpression plasmid, respectively. EdU assay, flow cytometer and Transwell assay were carried out respectively to verify the variations in the proliferation, apoptosis and invasion abilities of the cells. And the expression of autophagy related proteins LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ, ATG5 and ATG7 was measured by Western blotting. **Results** The expression levels of circVCAN, ATG5, ATG7 and LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ were significantly higher in FGR placenta tissue than in the normal group ($P<0.01$). The termination of pregnancy was earlier in FGR patients than in normal group ($P<0.05$), with newborns from the FGR group having lower birth body weight ($P<0.01$) and placenta weight ($P<0.05$) as well as shorter birth body length ($P<0.01$) when compared with those from the normal group. Silencing of circVCAN resulted in enhanced proliferation and invasion abilities in HTR8/SVneo

[基金项目] 重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0318);教育部生殖与发育国际合作联合实验室及高等学校学科创新引智计划
[通信作者] 董晓静,E-mail:xffdoctor@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

cells ($P<0.01$), while circVCAN overexpression led to decreased proliferation and invasion abilities in the cells ($P<0.01$), but no statistical difference was seen in the apoptotic rate ($P>0.05$). The expression levels of autophagy related proteins LC3Ⅱ/LC3Ⅰ, ATG5 and ATG7 were significantly lower in circVCAN interfered cells ($P<0.05$), while higher in circVCAN overexpressed cells ($P<0.05$). **Conclusion** CircVCAN is highly expressed in FGR placenta tissue, though it showing no effect on apoptosis but inhibiting the proliferation and invasion of HTR8/SVneo trophoblast cells, and may enhance autophagy by promoting the expression of ATG5 and ATG7.

[**Key words**] circVCAN; fetal growth restriction; HTR8/SVneo trophoblast cells; proliferation; invasion; autophagy

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-msxmX0318) and the Innovation and Intelligence Project of International Cooperation Joint Laboratory of Reproduction and Development of Ministry of Education and Higher Education. Corresponding author: DONG Xiaojing, E-mail: xffdoctor@163.com

胎儿生长受限(fetal growth restriction,FGR)指胎儿体质量低于同孕龄正常体质量的第10百分位数[1],是导致围生儿病死率升高的主要原因[2],幸存儿智力落后、神经功能障碍、心脑血管疾病、糖尿病等远期并发症发生率明显增加[3-4],严重影响人口素质,给家庭及社会造成严重的经济负担。环状RNA(circular RNA,circRNA)是一种特殊的内源性非编码RNA,具有高稳定性、高保守性以及组织特异性[5]。既往多项研究提示,circRNA参与肿瘤、心脏疾病、子痫前期等多种疾病的发生,可影响细胞增殖、侵袭、迁移及自噬[6-7],目前认为circRNA的作用机制主要是充当mRNA/miRNA的海绵,竞争性的抑制mRNA/miRNA的转录调控[8-9]。关于circRNA在FGR中的研究,有研究报道,hsa_circ_0000848可通过hsa-miR-6768-5p直接调控胎盘滋养细胞的侵袭、迁移及凋亡,参与FGR的发生[10]。本课题组通过全转录组测序对比分析circRNA在FGR及正常妊娠胎盘组织中的表达,发现circVCAN等多个circRNA均有差异性表达。本研究以circVCAN为研究对象,验证其在FGR及正常妊娠胎盘组织中的表达,并通过体外实验初步确定circVCAN对胎盘滋养细胞HTR8/Svneo增殖、侵袭、凋亡及自噬的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2018年1月~2018年12月在重庆医科大学附属第二医院终止妊娠的FGR及正常孕妇胎盘组织各12例,所选病例均排除妊娠合并慢性高血压、子痫前期、妊娠期糖尿病、妊娠期肝内胆汁淤积症及其他内科合并症。研究对象均签署知情同意书,研究方案获重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准[科伦预审第(2019)070号],符合《赫尔辛基宣言》的伦理准则。HTR8/SVneo滋养细胞由加拿大皇后大学Charles H. Graham博士以及重庆医科大学附属第一医院妇产科漆洪波教授惠赠,传代并保存于重庆医科大学附属第二医院妇产科实验室。实验用品:RPMI1640培养基、Transwell小室购自Corning公司;胎牛血清购自北京赛澳美公司;细胞胰酶消化液、总蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶配制试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;circRNA反转录及实时定量PCR试剂盒购自复能基因有限公司;助转染试剂transfect-mate、circVCAN干扰质粒(si-circVCAN)以及过表达质粒(ov-circVCAN)购自上海吉玛基因股份有限公司;circVCAN干扰质粒(si-circVCAN)的序列为5′-GGCAGCACACUGGUCG-AAUTT-3′,阴性对照si-NC的序列为5′-UUCUCCG-AACGUGUCACGUTT-3′;过表达质粒(ov-circVCAN)则是将circVCAN的全长编码序列克隆到pcDNA3.1(+)载体中获得,空白pcDNA3.1(+)载体作为阴性对照;TRIzol试剂、RIPA蛋白裂解液、Lipofectamine 2000购均购自美国Invitrogen公司;LC3、ATG5、ATG7抗体购CST生物公司,抗体目录编号分别为LC3:12741T、ATG5:12994T、ATG7:8558T,ECL发光试剂盒购买自美国Millipore公司;EdU试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司;Matrigel基质胶购自美国Becton Dickinson公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 采用RPMI1640完全培养基加入10%胎牛血清复苏、培养HTR8/SVneo滋养细胞,将细胞置于37 ℃和5% CO_2的孵育箱中培养,待细胞长至80%~90%左右,用0.25%的胰酶在37 ℃孵育箱中消化90s进行传代。质粒转染实验分组如下:si-NC组(转染circVCAN阴性对照)、si-circVCAN组(转染circVCAN干扰序列)、ov-NC组(转染circVCAN过表达载体阴性对照)、ov-circVCAN组(转染circVCAN

https://www.zhangqiaokeyan.com

过表达载体质粒),每组设置 3 个复孔,转染前 1 d 将细胞接种于 6 孔板中,待细胞融合度达约 50%时,按照 Transfect-mate 助转染试剂及 Lipofectamine 说明书按步骤进行沉默及过表达转染。

1.2.2 qRT-PCR 检测 circVCAN 表达水平 采用 TRIzol 试剂从组织及细胞中提取总 RNA,反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板,用 circRNA 实时定量 PCR 试剂盒进行 PCR。内参 β-actin 序列如下:正义引物:5′-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3′,反义引物:5′-AAAGAAAGGGTGTAAAACGCA-3′;circVCAN 引物序列如下:正义引物:5′-CTGATGGCAGCACACTGGTC-3′,反义引物:5′-TCATGCACTGGATCTGTTTCTTCAC-3′。每个样品均设 3 个复孔,实验均重复 3 次,以 β-actin 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 方法分析基因表达的相对变化。

1.2.3 EdU 增殖实验 HTR8/SVneo 滋养细胞转染 48 h 后,在 24 孔板中每孔种入约 1×10^5 个细胞,24 h 后更换为 EdU 培养基(细胞培养基按 1 000∶1的比例稀释 EdU 试剂 A)孵育 2 h,然后使用多聚甲醛固定,甘氨酸清洗后用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 摇床孵育、清洗,随后加入 1×Apollo(阿波罗)染色,后用含 0.5% Triton X-100 的 PBS、甲醇及 PBS 依次清洗,DAPI 染色后 PBS 再次清洗,荧光显微镜计数分析,实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 HTR8/SVneo 滋养细胞转染 48 h 后,收集约 1×10^6 个细胞 ,4 ℃预冷的 PBS 洗 2 次 ,1 000 r/min 离心 5 min,用 5 00 μL 结合缓冲液重悬细胞,取 100 μL 细胞悬液于 5 mL 流式管中,加入 5 μL Annexin V/FITC 和 10 μL、20 ng/mL PI 溶液,混匀后室温避光孵育 15 min,在反应管中加入 400 μL PBS,采用流式细胞仪 FACS 分析各组转染细胞凋亡率。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 提前将基质胶置于 4 ℃冰箱融解,移液枪、枪头盒等置于 -20 ℃预冷,用 RPMI1640 培养基以 9∶1的比例稀释基质胶,混匀后每孔取 50 μL 均匀铺于小室上层,下室加入 500 μL 完全培养基(含 10%胎牛血清),上室加入 200 μL 无血清 RPMI1640 培养液,每个小室经计数均匀接种 5×10^4 个细胞,37 ℃、5% CO_2 条件下培养,24 h 后取出小室,PBS 清洗 3 次,用多聚甲醛固定 30 min,用棉签拭去上室内侧壁细胞,外侧壁细胞经结晶紫染色 20 min 后于正置显微镜(200×)下观察并计数,实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测自噬相关蛋白表达 HTR8/SVneo 细胞经转染处理 48 h 后用裂解液充分裂解提取总蛋白,胎盘组织剪碎用匀浆机裂解后使用裂解液提取总蛋白,用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度并调平浓度,加入蛋白上样缓冲液充分混合,沸水煮 10 min 后冷却备用。制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每孔上样 20 μg,依次电泳、转膜,用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,孵 LC3、ATG5、ATG7 一抗(稀释比例均为 1∶1 000)内于 4 ℃冰箱过夜,洗膜,室温下孵二抗 2 h(稀释比 1∶1 000),再洗膜后用 ECL 试剂盒进行显影,ImageJ 软件行半定量分析,实验均重复 3 次。

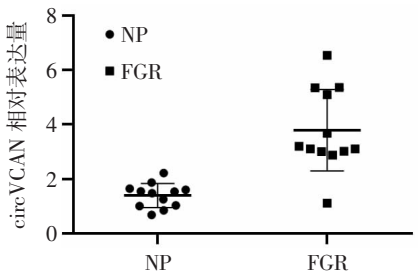
1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 统计软件对各数据进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布数据用中位数表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 circVCAN 在 FGR 和正常妊娠孕妇胎盘组织中的表达水平

CircVCAN 在 FGR 组胎盘组织中的表达量显著高于正常妊娠组($P<0.01$,图 1)。与正常妊娠孕妇相比较,FGR 组孕妇平均分娩孕周较正常妊娠组早($P<0.05$),FGR 组胎儿出生体质量较正常妊娠组显著减轻($P<0.01$),FGR 组胎儿出生身长明显短于正常妊娠组($P<0.01$),FGR 组胎盘质量明显轻于正常妊娠组($P<0.05$,表 1)。



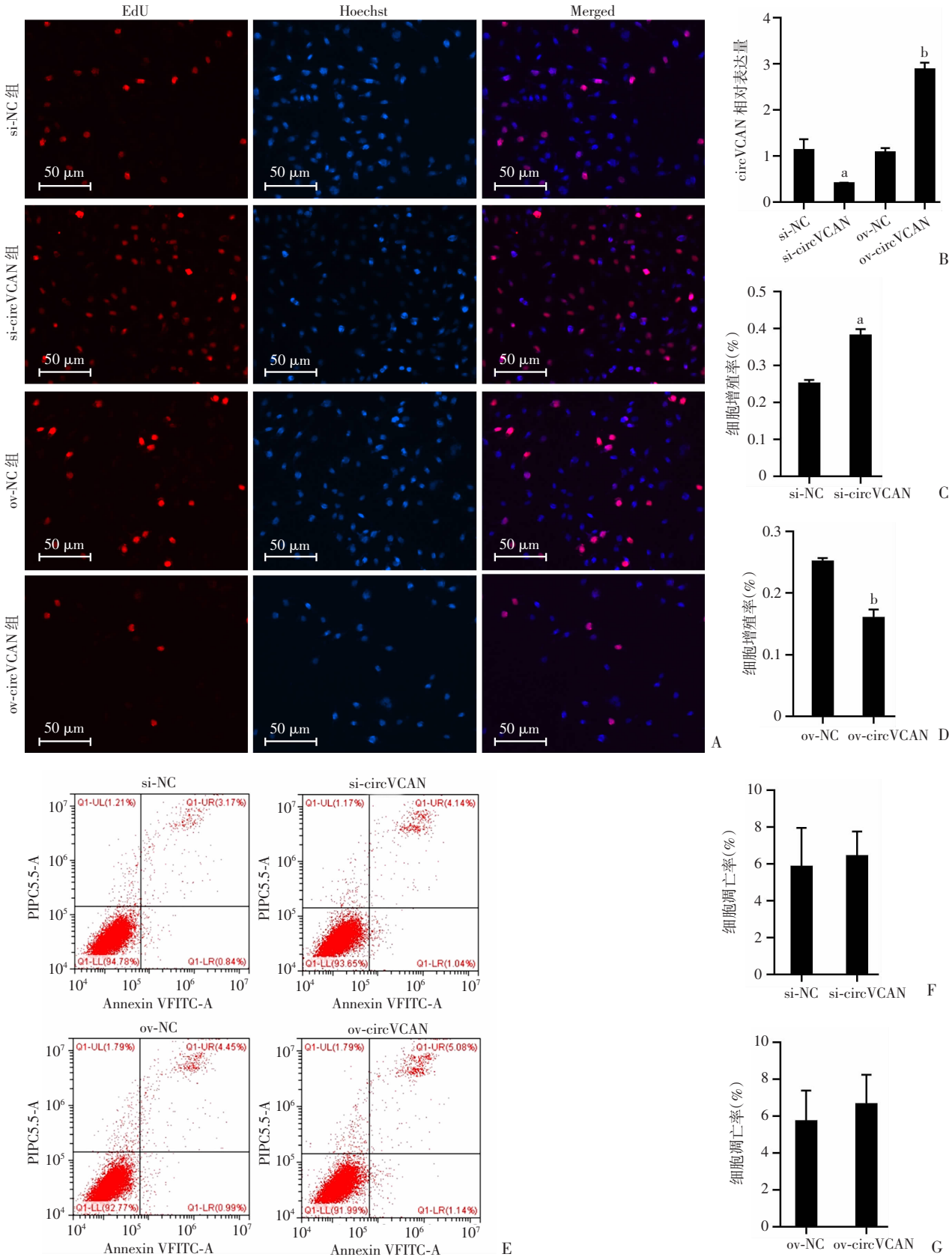
a:$P<0.01$,与 NP 组比较

图 1 circVCAN 在 FGR 和正常妊娠孕妇胎盘组织中的表达水平

2.2 circVCAN 对 HTR8/SVneo 滋养细胞增殖、凋亡的影响

在 HTR8/SVneo 细胞中转染 circVCAN 沉默和过表达质粒后,circVCAN 表达分别被成功下调和上调($P<0.01$,图 2A)。与对照组细胞相比较,转染 circVCAN 干扰质粒的 HTR8/SVneo 细胞增殖率显著升高($P<0.01$,图 2B、C),而转染 circVCAN 过表达质粒的 HTR8/SVneo 细胞增殖率显著降低($P<0.01$,图 2B、D),细胞凋亡率差异均无统计学意义($P>0.05$,图 2E、F、G)。

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



a: $P<0.01$,与 si-NC 组比较;b: $P<0.01$, 与 ov-NC 组比较 A: EdU 实验检测各组细胞增殖能力(倒置荧光显微镜 ×100); B: qRT-PCR 实验检测各组细胞 circVCAN 的相对表达量; C、D: 各组细胞增殖率分析; E:流式细胞仪检测各组细胞凋亡; F、G:各组细胞凋亡率分析

图 2 circVCAN 对 HTR8/SVneo 滋养细胞增殖、凋亡的影响

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

表 1 正常妊娠孕妇与 FGR 妊娠孕妇的各项指标分析 ($\bar{x}\pm s$)

项目	NP(n=12)	FGR(n=12)	P 值
年龄	29.83±5.15	30.17±4.91	NS
身高/cm	157.83±3.74	157.75±5.15	NS
体质量/kg	68.83±3.41	68.83±8.54	NS
增长体质量/kg	14.67±2.87	12.67±5.63	NS
怀孕次数/次	2.08±0.79	2.75±1.36	NS
分娩次数/次	0.50±0.67	0.25±0.45	NS
分娩孕周/周	38.88±1.09	36.39±2.41	<0.05
胎儿出生体重/kg	3.42±0.24	1.98±0.41	<0.01
胎儿出生长度/cm	50.17±0.83	43.83±3.71	<0.01
胎盘质量/kg	0.50±0.01	0.40±0.10	<0.05

2.3 circVCAN 对 HTR8/SVneo 细胞侵袭的影响

在 Transwell 实验中,circVCAN 沉默组穿过小室的细胞数较对照组明显增多(P<0.01 图 3A),circVCAN 过表达组穿过小室的细胞数较对照组显著减少(P<0.01,图 3B),该结果提示 circVCAN 能抑制 HTR8/SVneo 细胞侵袭。

2.4 circVCAN 促进自噬相关蛋白 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、ATG5、ATG7 表达

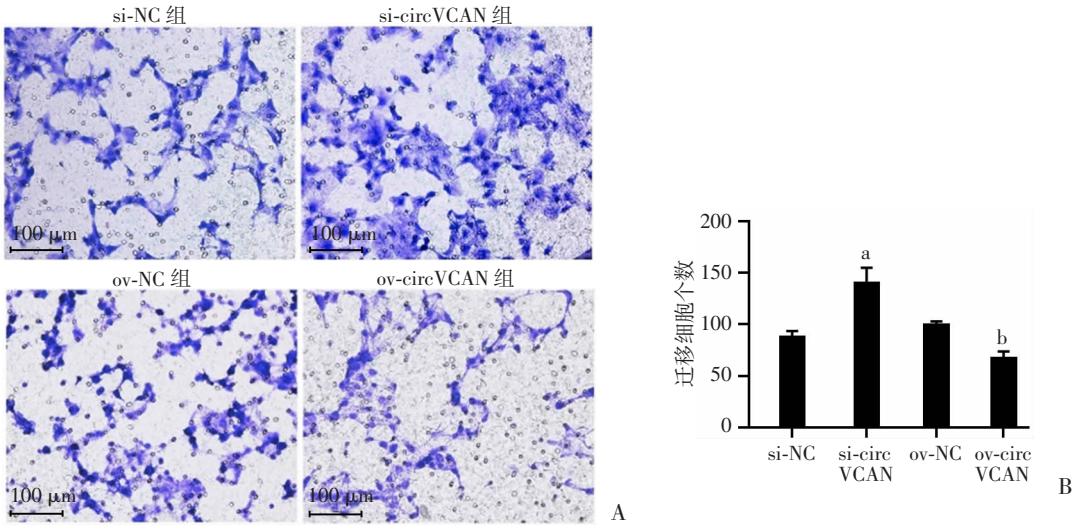
与对照组 HTR8/SVneo 细胞相比,自噬相关蛋白 ATG5、ATG7、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ在 circVCAN 沉默组细胞中的表达均显著降低(P<0.05 图 4F、G),而在 circVCAN 过表达组细胞中的表达水平均显著升高(P<0.05,图 4F、G)。同时,我们观察到,与正常妊娠组相比,FGR 组胎盘组织中 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、ATG5、ATG7 均显著增加(P<0.05 图 4A、B、C、D、E)。这些结果显示,在 FGR 中,circVCAN 可能通过上调自噬相关蛋白 ATG5、ATG7 的表达而促进自噬过程。

3 讨论

FGR 是一种严重的妊娠期并发症,可能影响胎儿各器官发育,与新生儿成年后认知缺陷、骨质疏松等密切相关[11-12]。FGR 的发病机制主要包括氧化应激、免疫失衡、胎盘功能不良等[13]。自噬现象本身存在于正常胎盘中,但在 FGR 胎盘组织中被过度激活,饥饿和缺氧刺激均可诱导自噬[14]。用 DNA 甲基化芯片对比分析 FGR 组与正常组的胎盘组织,发现约有 284 个不受孕周影响的差异甲基化位点,与自噬、氧化应激反应及激素等信号通路相关[15]。寨卡病毒可通过胎盘屏障进入羊水及胎儿脑组织,损害神经发育导致小头畸形及 FGR,而自噬可能参与病毒复制及胎盘转运过程[16-17]。因此,自噬亦可能是 FGR 发病的关键环节。

circRNA 广泛存在于哺乳动物中且具有高度的稳定性和保守性[18],因此是疾病诊断及预后较好的标志物。研究表明,circRNA 可能通过调节细胞增殖、侵袭、自噬等参与肝癌、乳腺癌、神经胶质瘤等疾病的发生[19-21],其中包括 circRNA 作用于胎盘滋养细胞参与子痫前期发病[22]。

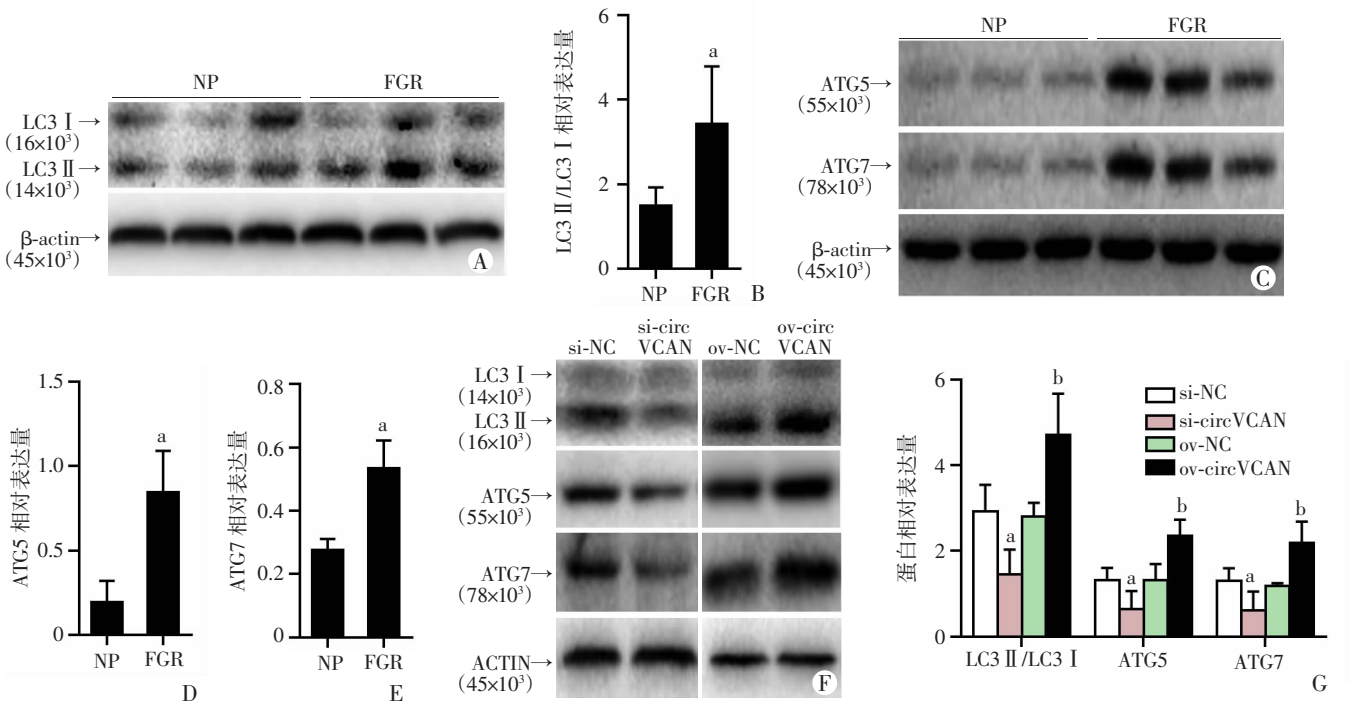
本研究对象 circVCAN 位于 5 号染色体 chr5:82832825-82850857 区域(circbase),有研究提示 circVCAN(hsa_circ_0073237)与神经胶质瘤的放疗耐药性有关,可通过与 miR-1183 直接结合促进神经胶质细胞的增殖、侵袭、迁移,抑制其凋亡[23]。本研究发现 circVCAN 在 FGR 胎盘组织中表达明显升高,FGR 组



A:Transwell 实验检测各组 HTR8/SVneo 细胞侵袭能力(倒置荧光显微镜 ×100);B:侵袭率分析 a:P<0.01 与 si-NC 组比较;b:P<0.01,与 ov-NC 组比较

图 3 circVCAN 抑制 HTR8/SVneo 细胞侵袭

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



A: Wsetern blot 检测正常胎盘组织与 FGR 胎盘组织中 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ的相对表达量;B:半定量结果分析 a:$P<0.05$,与 NP 组比较 C: Wsetern blot 检测正常胎盘组织与 FGR 胎盘组织中 ATG5、ATG7 的相对表达量;D、E:半定量结果分析 a:$P<0.01$,与 NP 组比较 F: Wsetern blot 检测 circVCAN 对各组 HTR8/SVneo 细胞 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、ATG5、ATG7 蛋白的影响;G:半定量结果分析 a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较;b:$P<0.05$,与 ov-NC 组比较

图 4 沉默及过表达 circVCAN 后对自噬相关蛋白 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、ATG5 及 ATG7 表达的影响

胎盘质量、胎儿出生体质量、身长均较正常妊娠组显著降低,同时,FGR 胎盘组织中自噬相关蛋白 ATG5、ATG7、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ表达水平均显著升高,提示 FGR 胎盘自噬被促进,这与既往关于 FGR 的研究一致[13,24]。进一步体外实验结果显示,circVCAN 对 HTR8/SVneo 细胞凋亡无影响,干扰 circVCAN 表达能促进 HTR8/SVneo 细胞增殖及侵袭,而过表达 circVCAN 能抑制 HTR8/SVneo 细胞增殖及侵袭。与此同时,我们发现,circVCAN 可促进 HTR8/SVneo 细胞的自噬,其机制可能为通过调节自噬相关蛋白 ATG5、ATG7 的水平,从而调节 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ的表达。上述结果提示,circVCAN 可能通过抑制 HTR8/SVneo 滋养细胞的增殖、侵袭,促进其自噬,从而影响胎盘发育及功能,进而参与 FGR 的发生。

本研究初步探索了 circVCAN 在 FGR 胎盘组织中的表达及其对 HTR8/SVneo 滋养细胞生物学行为的影响,但涉及的临床病例数较少且未阐明 circVCAN 的详细作用机制,我们将在后续实验中对此进行深入研究。

参考文献:

[1] SHARMA D, SHASTRI S, FARAHBAKHSH N, *et al*. Intrauterine growth restriction-part 1[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2016, 29(24): 3977-3987. DOI: 10.3109/14767058.2016.1152249.

[2] KHAN K S, WOJDYLA D, SAY L, *et al*. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review[J]. Lancet, 2006, 367(9516): 1066-1074. DOI: 10.1016/s0140-6736(06)68397-9.

[3] THORNTON J G, HORNBUCKLE J, VAIL A, *et al*. Infant wellbeing at 2 years of age in the Growth Restriction Intervention Trial (GRIT): multicentred randomised controlled trial[J]. Lancet, 2004, 364(9433): 513-520. DOI: 10.1016/s0140-6736(04)16809-8.

[4] GALE C R, MARTYN C N, KELLINGRAY S, *et al*. Intrauterine programming of adult body composition[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(1): 267-272. DOI: 10.1210/jcem.86.1.7155.

[5] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, *et al*. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2): 141-157. DOI: 10.1261/rna.035667.112.

[6] 李墨林, 陈航, 黄平. 环状 RNA circSP3(hsa-circ-0002642)促进肝细胞癌细胞增殖及迁移[J]. 第二军医大学学报, 2019, 40(12): 1330-1336. DOI: 10.16781/j.
http://xuebao.shsmu.edu.cn/

0258-879x.2019.12.1330.
LI M L, CHEN H, HUANG P. Circular RNA circSP3 (hsa-circ-0002642) promotes proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. Acad J Second Mil Univ, 2019, 40(12): 1330-1336. DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.12.1330.

[7] DU W W, YANG W, LI X, *et al*. A circular RNA circ-DNMT1 enhances breast cancer progression by activating autophagy[J]. Oncogene, 2018, 37(44): 5829-5842. DOI: 10.1038/s41388-018-0369-y.

[8] WANG K, LONG B, LIU F, *et al*. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223[J]. Eur Heart J, 2016, 37(33): 2602-2611. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv713.

[9] DENG N, LEI D, HUANG J, *et al*. Circular RNA expression profiling identifies hsa_circ_0011460 as a novel molecule in severe preeclampsia[J]. Pregnancy Hypertens, 2019, 17: 216-225. DOI: 10.1016/j.preghy.2019.06.009.

[10] WANG H, ZHANG J M, XU Z Y, *et al*. Circular RNA hsa_circ_0000848 promotes trophoblast cell migration and invasion and inhibits cell apoptosis by sponging hsa-miR-6768-5p[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 278. DOI: 10.3389/fcell.2020.00278.

[11] WANG Y, FU W, LIU J. Neurodevelopment in children with intrauterine growth restriction: adverse effects and interventions[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2016, 29(4): 660-668. DOI: 10.3109/14767058.2015.1015417.

[12] GLUCKMAN P D, HANSON M A, COOPER C, *et al*. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease[J]. N Engl J Med, 2008, 359(1): 61-73. DOI: 10.1056/ nejmra0708473.

[13] TANTBIROJN P, CRUM C P, PARAST M M. Pathophysiology of placenta creta: the role of decidua and extravillous trophoblast[J]. Placenta, 2008, 29(7): 639-645. DOI: 10.1016/j.placenta.2008.04.008.

[14] CURTIS S, JONES C J P, GARROD A, *et al*. Identification of autophagic vacuoles and regulators of autophagy in villous trophoblast from normal term pregnancies and in fetal growth restriction[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013, 26(4): 339-346. DOI: 10.3109/14767058.2012.733764.

[15] HILLMAN S L, FINER S, SMART M C, *et al*. Novel DNA methylation profiles associated with key gene regulation and transcription pathways in blood and placenta of growth-restricted neonates[J]. Epigenetics, 2015, 10(1): 50-61. DOI: 10.4161/15592294.2014.989741.

[16] CUGOLA F R, FERNANDES I R, RUSSO F B, *et al*. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models[J]. Nature, 2016, 9;534(7606): 267-271. DOI: 10.1038/nature18296.

[17] ZHANG Z W, LI Z L, YUAN S. The role of secretory autophagy in zika virus transfer through the placental barrier[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 6: 206. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00206.

[18] RYBAK-WOLF A, STOTTMEISTER C, GLAŽAR P, *et al*. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. Mol Cell, 2015, 58(5): 870-885. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.03.027.

[19] YU J, XU Q G, WANG Z G, *et al*. Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2018, 68(6): 1214-1227. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.012.

[20] DU W W, YANG W N, LI X M, *et al*. A circular RNA circ-DNMT1 enhances breast cancer progression by activating autophagy[J]. Oncogene, 2018, 37(44): 5829-5842. DOI: 10.1038/s41388-018-0369-y.

[21] HUANG R R, ZHANG Y, HAN B, *et al*. Circular RNA HIPK2 regulates astrocyte activation via cooperation of autophagy and ER stress by targeting MIR124-2HG[J]. Autophagy, 2017, 13(10): 1722-1741. DOI: 10.1080/15548627.2017.1356975.

[22] OU Y, ZHU L, WEI X, *et al*. Circular RNA circ_0111277 attenuates human trophoblast cell invasion and migration by regulating miR-494/HTRA1/Notch-1 signal pathway in preeclampsia[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(6): 479. DOI: 10.1038/s41419-020-2679-6.

[23] ZHU C, MAO X, ZHAO H. The circ_VCAN with radioresistance contributes to the carcinogenesis of glioma by regulating microRNA-1183[J]. Medicine (Madr), 2020, 99(8): e19171. DOI: 10.1097/md.0000000000019171.

[24] ZHANG L, DENG X R, SHI X, *et al*. Silencing H19 regulated proliferation, invasion, and autophagy in the placenta by targeting miR-18a-5p[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 9006-9015. DOI: 10.1002/jcb.28172.

(收稿:2020-10-14;修回:2020-12-03)
(编辑 王 红)

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/