

生殖系疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002367

子痫前期胎盘组织环状 RNA 表达谱的鉴定、验证与分析

陈 维¹,白宇翔²,饶海英³,陶越兰²,漆洪波²,罗 欣²(1. 重庆医科大学附属第一医院急诊重症医学科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院产科,重庆 400016;
3. 成都市妇女儿童中心医院,成都 610000)

【摘要】目的:描绘人胎盘组织中环状 RNA(circular RNA, circRNA)的表达谱,发现并验证子痫前期胎盘组织异常表达的 circRNA,研究分析其可能的调控网络。**方法:**利用高通量测序技术对子痫前期和正常胎盘组织中 RNA 进行测序和鉴定分析,并利用 DeSeq2 进行差异性分析。然后利用 qRT-PCR 在组织水平上对分析结果进行验证。随后利用生物信息学对验证的差异性 circRNA 进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。**结果:**测序结果显示,与正常胎盘组织相比,重度子痫前期胎盘共检测出 300 种异常表达的 circRNA,包括 151 种高表达和 149 种低表达。qRT-PCR 验证结果显示, hg38_circ_0014736 ($1.418\ 0 \pm 0.106\ 5$ vs. $1.044\ 0 \pm 0.127\ 1$, $P=0.035$) 和 hsa_circ_0015382 ($0.895\ 8 \pm 0.180\ 2$ vs. $0.688\ 8 \pm 0.025\ 3$, $P=0.025$) 在子痫前期胎盘组织中高表达, hsa_circ_0007121 ($0.395\ 8 \pm 0.200\ 4$ vs. $1.301\ 0 \pm 0.240\ 7$, $P=0.000$) 在子痫前期胎盘组织中明显下调。生物信息学分析显示这些异常表达的 circRNA 与预测到的靶 miRNA 及靶基因可能参与调节细胞增殖、缺氧应激、转录后调控等功能。**结论:**与正常胎盘组织相比,子痫前期胎盘组织存在异常表达的 circRNA。生物信息学分析显示,这些异常表达的 circRNA 或可以通过某些通路参与子痫前期发病。

【关键词】子痫前期;胎盘组织;环状 RNA;高通量测序**【中图分类号】**R714.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-04-04

Identification and analysis profiles of circular RNAs in preeclamptic placenta

Chen Wei¹, Bai Yuxiang², Rao Haiying³, Tao Yuelan², Qi Hongbo², Luo Xin²

(1. Department of Emergency & Intensive Care Units, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Chengdu Women's and Children's Central Hospital)

【Abstract】Objective: To describe the expression profile of circular RNA (circRNA) in human placental tissues, explore and identify abnormal circRNAs in preeclampsia (PE) placental tissue and study its possible regulating network. **Methods:** RNA sequencing and evaluation analysis in PE placental tissue and normal placental tissue were performed by high-throughput RNA sequencing technology, DeSeq2 was used to analyze difference, and qRT-PCR was used to identify the analysis tissue. Bioinformatics was used to perform the gene ontology (GO) analysis and the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis in the identified differential circRNA. **Results:** According to the sequencing results, 300 differentially expressed circRNAs were found in the severe PE placenta when compared with the normal placenta, including 151 kinds of upregulated circRNAs and 149 kinds of downregulated circRNAs. The qRT-PCR results showed that expression levels of hg38_circ_0014736 ($1.418\ 0 \pm 0.106\ 5$ vs. $1.044\ 0 \pm 0.127\ 1$, $P=0.035$) and hsa_circ_0015382 ($0.895\ 8 \pm 0.180\ 2$ vs. $0.688\ 8 \pm 0.025\ 3$, $P=0.025$) were significantly higher in the PE placenta tissue; expression levels of hsa_circ_0007121 ($0.395\ 8 \pm 0.200\ 4$ vs. $1.301\ 0 \pm 0.240\ 7$, $P=0.000$) were significantly decreased in PE placenta compared with normal placenta. Bioinformatics analysis revealed that those three circRNAs, predicted target miRNAs and target gene might have a relationship with cell proliferation, response to hypoxia and post-transcriptional regulation. **Conclusion:** Compared with the normal placental tissue, abnormal expressive circRNA exists in the PE placental tissue. According to the bioinformatics,

those abnormal circRNAs may play a potential role in the pathogenesis of PE.

【Key words】preeclampsia; placenta; circRNA; high-throughput RNA sequencing

作者介绍:陈 维, Email: amandaweichen@163.com,

研究方向:产科急危重症。

通信作者:罗 欣, Email: mimikoko1982@163.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81771614)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20191127.1139.018.html>

(2019-11-27)

子痫前期(preeclampsia, PE)是一种妊娠期特发的全身性疾病,也是产科常见的危重症。该疾病在全球范围内发病率为 4%~8%,其严重并发症子痫和 HELLP 综合征是导致孕产妇和围产儿死亡的最常见原因^[1]。迄今为止,由于其发病机制不明确,目前尚无有效的预测和预防手段,终止妊娠仍是唯一有效的治疗措施,但随之带来的母体并发症和医源性早产等问题会给家庭及社会带来双重负担。因此,子痫前期的发病机制亟待阐明。

目前的研究认为滋养细胞侵袭能力减弱所致的“螺旋动脉重铸障碍”“胎盘浅着床”是子痫前期发病的关键环节^[2]。研究表明,非编码 RNA 在调控细胞功能及在疾病发生发展上起着非常重要的作用^[3]。circRNA 是一种新晋内源性非编码 RNA,近来被发现广泛表达于真核细胞中^[4-8]。现在的研究认为, circRNA 具有一定的组织特异性、表达时序性和稳定性,在调控生物功能上可能发挥着重要作用^[9-11]。来自大量的生物信息学分析显示 circRNA 序列中含有 miRNA 结合位点,可作为一种天然的、内源性的 miRNA“海绵”^[5-6,12-16]。据此推测, circRNA 可通过互补的结合位点吸附 miRNA,进而阻断 miRNA 对其靶基因的调控。随后的许多研究证实 circRNA 参与调控多种细胞功能,包括增殖^[12-13]、凋亡^[17]、迁移和侵袭^[13]。而已有的研究证实子痫前期患者胎盘滋养细胞上述功能出现异常,但其原因尚不明确。由此猜想,子痫前期胎盘组织中可能也存在某种或某些异常表达的 circRNA,在子痫前期的发生发展中起到非常重要的作用。因此,非常有必要对子痫前期胎盘组织中 circRNA 的表达进行鉴定和分析。

1 材料和方法

1.1 胎盘样本采集及处理

本研究所用胎盘组织采集于 2016 年 12 月至 2018 年 12 月在重庆医科大学附属第一医院产科行剖宫产分娩的孕妇。本研究获得重庆医科大学伦理委员会的支持,且所有患者均被告知并签署知情同意书。研究对象设定为初产妇、单胎妊娠,并排除合并内科疾病、有宫颈操作史、流产史、胎儿畸形或者已进行医疗干预的患者。重度子痫前期的诊断标准如下:妊娠 20 周后新发高血压,且收缩压 ≥ 160 mmHg 或舒张压 ≥ 110 mmHg;或者伴有明显的蛋白尿;或者出现其他器官受累症状,如肺水肿、肝功异常尤其是肝酶异常、持续性上腹痛、进行性肾损伤、视物模糊或头痛等症状^[18]。对照组则是在与子痫前期组匹配年龄、样本采集时间后随机挑选的正常孕妇。本研究共纳入 17 例重度子痫前期孕妇,正常孕妇 17 例;共收集胎盘组织 34 例。研究对象临床资料统计结果见表 1。

1.2 胎盘组织采集及 RNA 提取

胎盘经剖宫产分娩方式娩出 1 h 内完成采样。以脐带附着位点为中心,将胎盘分为 4 个象限,在胎盘边缘与脐带附着位点中间、母体面与胎儿面间,避免明显的钙化点、大血管及梗死灶,各象限随机采样,样本大小约 8 cm³。游离的样本组织浸入预冷的生理盐水中,快速转移至实验室。无菌条件下分离胎盘组织表面附着的蜕膜组织,并将胎盘组织剪成 0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 大小组织块,预冷生理盐水充分洗涤。将处理后的胎盘组织浸没于 RNAlater 试剂 (Qiagen, Mainz, Germany), -80 $^{\circ}$ C 储存,备后续实验。

胎盘组织 RNA 的提取采用 Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 法,每克组织加入 Trizol 试剂 1 mL,提取操作按照试剂说明书进行。所提取的 RNA 纯度与浓度经 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK) 检测,并于 -80 $^{\circ}$ C 储存。

1.3 RNA 高通量测序

5 例重度子痫前期和 5 例正常胎盘组织用于 RNA 测序。

表 1 研究对象临床资料对比分析

	子痫前期	正常孕妇	$F\chi^2$ 值	P 值
孕妇年龄	30.12 $\pm$ 1.06	29.24 $\pm$ 0.85	1.547	0.519
分娩时孕周	36.51 $\pm$ 0.57	39.41 $\pm$ 0.18	10.230	0.000
孕妇 BMI (kg/m ²)	27.65 $\pm$ 0.67	27.30 $\pm$ 0.86	1.685	0.751
收缩压 (mmHg)	163.50 $\pm$ 2.48	112.20 $\pm$ 2.56	1.068	0.000
舒张压 (mmHg)	101.10 $\pm$ 2.25	67.47 $\pm$ 2.41	1.148	0.000
新生儿体重 (g)	3 046.00 $\pm$ 148.60	3 482.00 $\pm$ 98.02	2.293	0.020
新生儿性别 ^a			0.472 ^b	0.630
男	9	7		
女	8	10		

注: BMI, 体质指数; a: 该组数据使用卡方检验; 其他数据以平均值 $\pm$ 标准差显示, 使用独立样本 t 检验进行统计分析; b: χ^2 值

从每例胎盘组织中提取约 5 μg 总 RNA, 并利用 Epicentre Ribo-zero™ rRNA Removal Kit 和 RNase R (Epicentre, USA) 预处理。将得到的经 RNA 核酸酶消化的去核糖体 RNA, 按照 NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit (NEB, USA) 使用说明书建立 RNA 文库。首先, RNA 经过 NEBNext First Strand 合成反应缓冲液裂解为小片段 RNA, 然后利用随机六聚体引物和 M-MuLV 逆转录酶合成第一链。随后利用 DNA 聚合酶 I 合成第二链, 并通过核酸外切酶或聚合酶作用使得片段末端转换为平端。之后, 使每条 DNA 片段 3' 端腺苷酸化, 并接上具有发卡结构的 NEBNext 插头, 以备杂交。合成的 DNA 片段需经 AMPure XP 系统 (Beckman Coulter, Beverly, USA) 纯化, 以获得长度 150~200 bp 的 DNA 片段。在 3 μL USER 酶作用下, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 15 min, 然后在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 5 min。经上述处理的 cDNA 片段在高保真 DNA 聚合酶、通用 PCR 引物和索引引物作用下进行扩增。扩增产物的质量由 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA) 检测, 合格后由 HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA) 测序平台对 DNA 片段以 120 bp 双端测序的方法进行测序。

1.4 circRNA 的鉴定和分析

对每一个样本, 通过测序所得到的读长信息 (Reads) 会通过 Bowtie v2.0.6 算法与从 UCSC 基因库 (<http://genome.ucsc.edu/>) 中获得的人基因组信息 (GRCh37/hg19) 进行比对, 去除错误的读长后, 用 TopHat v2.0.9 算法将双端测序读长与人基因组信息进行比对。不能与基因组匹配上的读长, 则会从 5' 端和 3' 端各提取 20 个碱基序列作为锚定序列 (anchor sequences) 再次与基因组序列进行比对。锚定序列按照 find_circ 的方法延长序列长度, 若延长的序列能匹配到基因组序列中, 断端一侧富含 GU/AG 剪切位点, 并且相同的剪切位点能至少被检测到 2 次, 该读长则被鉴定为 circRNA^[6]。样本间差异 circRNA 的分析则采用负二项式分布 (DESeq2) 进行统计分析。若差异倍数 ≥ 1.5 , 多重比较 $P < 0.05$, 则认为具有明显差异性。

1.5 circRNA 的表达在胎盘组织水平上的验证

利用实时荧光定量 PCR 技术 (real-time quantitative PCR, RT-PCR) 对鉴定出的 circRNA 表达水平进行验证。采用 Trizol 法提取 12 对胎盘组织 (子痫前期组、正常组各 12 例) 中的 RNA, 提取后的 RNA 按照逆转录试剂盒 (Prime Script™ RT reagent Kit, Takara, 大连, 中国) 的说明合成 cDNA, 然后采用荧光染料法进行扩增。操作在 CFX96 Touch™ Real-Time PCR 检测系统 (Bio-Rad, USA) 进行。使用的 SYBR Green 购自 Roche 公司 (Mannheim, 德国), 特异性引物由上海 Invitrogen 公司合成, 见表 2。GAPDH 作为内参基因, 退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。Ct 值的分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析。

1.6 差异性 circRNA 生物信息学分析

对发现并证实于子痫前期胎盘组织中异常表达的 circRNA, 利用 miRanda、TargetScan 软件对其潜在的调控 miRNA 进行预测, 并利用 miRanda、Targetscan、DIANA-microT 等软件对涉及的 miRNA 靶基因进行预测。为了研究这些差异性 circRNA 对细胞功能的影响及其可能的作用通路, 对这些 circRNA 潜在的靶基因还进行了 GO 分析和 KEGG 通路富集分析。

1.7 统计学处理

文中计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。利用 SAS (Version 9.4, SAS Institute, Carry, NC) 统计软件对数据进行统计分析。计量资料 2 组间采用非配对 t 检验, 计数资料采用卡方检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 circRNA 在子痫前期和正常胎盘组织中的表达

在所有胎盘组织中共检测出 22 796 种 circRNA。其中, 有 1 315 种 circRNA 表达于所有正常胎盘中; 1 444 种 circRNA 表达于所有子痫前期胎盘中, 如图 1A、B 所示。经过分析, 与正常胎盘组织相比, 共有 300 种 circRNA 在子痫前期胎盘中

表 2 PCR 实验中使用的引物

circRNA	正向引物	反向引物
hsa_circ_0015382	GTAACAACATGCTGAACGAC	ACTGTGGCTAATCAAGATGG
hsa_circ_0008674	CGATAGCTTCTGTAAATGGC	GTCTCCACAAACCGTTCAAT
hsa_circ_0002369	AACAGGTTGTACTTAGAT	ACAATTACAGCCATAGTGTT
hsa_circ_0007121	TCAGCGCAAGCTTCCATA	GCATTACAGCCACGCCATA
hsa_circ_0060558	TCAGCGCCAAGATGGCTCTC	ATGGTGACGCTAGCAGTGAC
hsa_circ_0006365	GCTTGCCAAGCTTGGATATGA	AACATCTGGCGGTATCTTCC
hsa_circ_0007694	CGATTACCTGATAGTAGTG	GATTATGGATGACTGATCC
hsa_circ_0002839	TGCAGAGCTTCTTCAAAG	TGCTCTGTTAGTTGATGGCA
hg38_circ_0008713 ^a	CAGAGATCTTCTACTGAAGT	TCTGTTATGAAAGGCACGAAG
hg38_circ_0014736 ^a	ACCATCATCACCATCTCCAT	TTGACTTGGCCTCTCCAAC
GAPDH	GCTGAGAACGGGAAGCTTGTC	CCAGGGGTGCTAAGCAGTTGCT

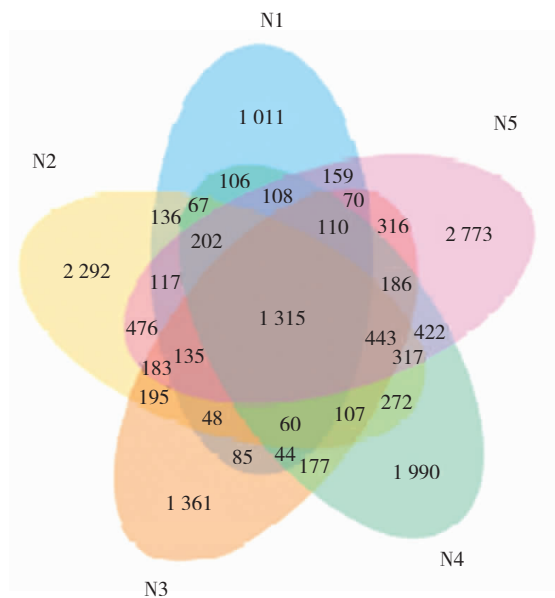
注: a, 该 circRNA 在 circBase 没有匹配到对应的名称, 由测序平台命名

的表达具有差异性(差异倍数 ≥ 2 , $P < 0.05$);包括 151 种高表达和 149 种低表达 circRNA(图 1C、D)。将差异 circRNA 的序列比对到 circBase 数据库中发现, 114 种已被数据库注释, 但有 186 种 circRNA 未能匹配到数据库中。

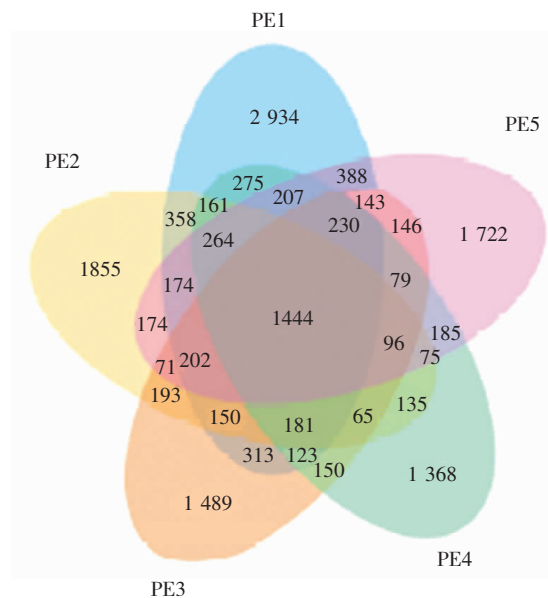
2.2 异常表达 circRNA 在胎盘组织水平上的验证

依照差异倍数、 P 值及表达丰度的大小, 本研究从 300 种差异表达的 circRNA 种分别选择 5 种高表达和低表达最为

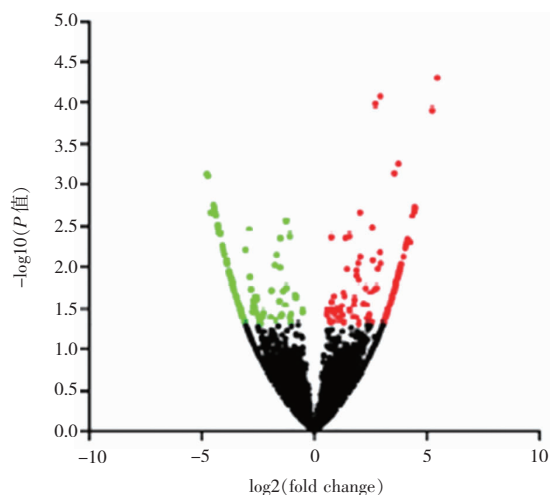
明显的 circRNA 进行验证, 这些差异性 circRNA 的序列信息、染色体位置、片段长度等测序信息见表 3。利用 RT-PCR 技术, 对这 10 种差异表达的 circRNA 表达情况在另外 12 例子痫前期胎盘组织和 12 例正常胎盘组织进行了检测。结果显示: hg38_circ_0014736 ($1.418 0 \pm 0.106 5$ vs. 1.0440 ± 0.1271 , $P = 0.035$) 和 hsa_circ_0015382 ($0.895 8 \pm 0.180 2$ vs. $0.688 8 \pm 0.025 3$, $P = 0.025$) 在子痫前期胎盘组织中高表达, 且差异具



A. 正常胎盘组织中 circRNA 表达谱

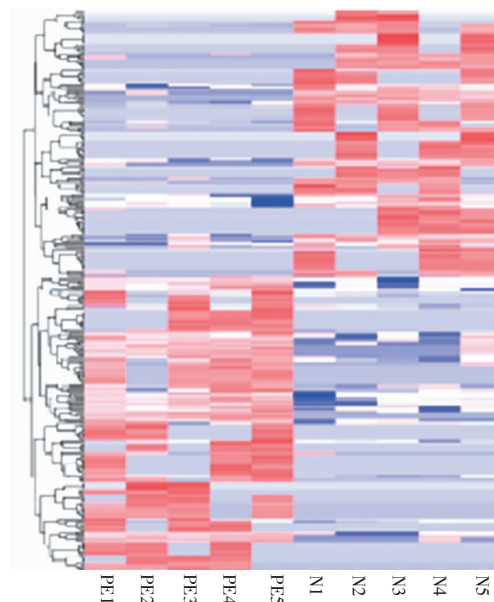


B. 子痫前期胎盘组织中 circRNA 表达谱



注: 垂直灰线表示差异倍数 ≥ 2 , 水平灰线表示 $P = 0.05$, 红点表示表达上调的 circRNAs, 绿点代表表达下调的 circRNAs (正常胎盘作为对照组)

C. 火山图



注: 红色代表高表达, 蓝色代表低表达

D. 测序样本 circRNA 表达热图

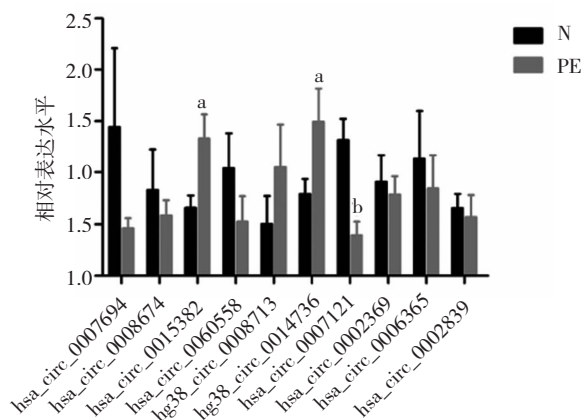
图 1 circRNA 在子痫前期和正常胎盘组织中的表达

表 3 用于验证实验的 circRNA 基本信息

	名称	circBase-ID	染色体	起始点	终止点	FC	P 值
上调	hg38_circ_0009805	hsa_circ_0015382	1	176594523	176595595	5.68	0.000
	hg38_circ_0017804	hsa_circ_0008674	5	65451474	65452918	2.95	0.004
	hg38_circ_0008713	NA	19	42234352	42234678	2.35	0.030
	hg38_circ_0014736	NA	3	133947255	133948971	4.11	0.008
	hg38_circ_0012010	hsa_circ_0002369	21	32694227	32695282	2.21	0.034
下调	hg38_circ_0016173	hsa_circ_0007121	4	159238808	159241368	2.84	0.004
	hg38_circ_0011704	hsa_circ_0060558	20	45902266	45902604	2.13	0.040
	hg38_circ_0020077	hsa_circ_0006365	7	66286510	66286709	3.38	0.010
	hg38_circ_0001154	hsa_circ_0007694	11	108267170	108267342	2.93	0.026
	hg38_circ_0006760	hsa_circ_0002839	17	29451454	29451680	2.60	0.019

注:FC 是 fold change 的简称,即差异倍数

有统计学意义,其他 3 种测序显示高表达的 circRNA 虽然也表现出高表达的趋势,但差异无统计学意义;而在测序显示低表达的 circRNA 中,hsa_circ_0007121 (0.3958 ± 0.2004 vs. 1.3010 ± 0.2407 , $P=0.000$)被证实于子痫前期胎盘组织中明显下调,其他虽有差异,但差异并不明显,无统计学意义,如图 2 所示。



注:GAPDH 为内参基因;a: $P<0.05$;b: $P<0.01$

图 2 差异性 circRNA 在胎盘组织中表达水平验证实验 ($n=12$)

2.3 生物信息学分析

为了探究这 3 种差异性 circRNA 对滋养细胞可能的影响,本研究利用生物信息学预测软件对其序列进行分析。结果发现,序列中含有多个 miRNA 结合位点,提示这 3 种差异性 circRNA 可能结合某些 miRNA,调控后者对下游靶基因的影响。因此,本研究利用 miRanda、Targetscan、DIANA-mi-croT 等预测软件进行预测。预测结果显示,有 15 种 miRNA 可以被至少 2 种软件预测。随即对这 15 种 miRNA 的靶基因进行预测,共预测到 249 种潜在靶基因,其中有 49 种靶基因可以被不同的预测软件预测到(图 3A)。基于上述预测的内容,本研究对这些基因的功能进行了 KEGG 通路富集分析和

GO 分析。KEGG 分析显示凋亡、Wnt 信号通路和 HIF-1 信号通路有明显富集现象(图 3B);同时,GO 分析结果显示这 3 种差异性 circRNA 可能跟转录后调节、增殖、蛋白结合及缺氧应激有关(图 3C)。

3 讨论

本研究利用高通量测序技术发现较多的 circRNA 表达于胎盘组织中,并且证实了与正常胎盘组织相比,子痫前期胎盘中存在异常表达的 circRNA。其他研究也曾报道过利用芯片发现 circRNA 和异常 circRNA 表达于子痫前期胎盘组织和孕妇外周血细胞中^[20-22]。由于 circRNA 的研究尚处于起步阶段,目前无统一的命名法,虽然难以比较不同研究中报道的 circRNA 是否存在重叠或不一致的地方,但却也在一定程度上相互印证胎盘组织中确有 circRNA 的表达。需要指出的是,本研究纳入的子痫前期患者需要在足月前终止妊娠。因此,2 组间很难匹配孕周。本研究中 2 组胎盘组织间 circRNA 表达的差异性不能完全除外孕周的影响。但据 Qian 等^[20]的研究,与早产非 PE 组胎盘组织相比,PE 胎盘仍存在异常表达的 circRNA。相较于各种早产因素对胎盘组织 circRNA 表达谱可能产生影响,尤其是潜在的炎症反应,本研究认为孕周差异性对 circRNA 差异性分析的影响可能更小。因此,本项研究中 hsa_circ_0007121、hsa_circ_0015382 和 hg38_circ_0014736 在 2 组胎盘组织中表达水平的差异性可能跟子痫前期发病更为相关。

本研究通过生物信息学分析还发现 hsa_circ_0007121、hsa_circ_0015382 和 hg38_circ_0014736 序

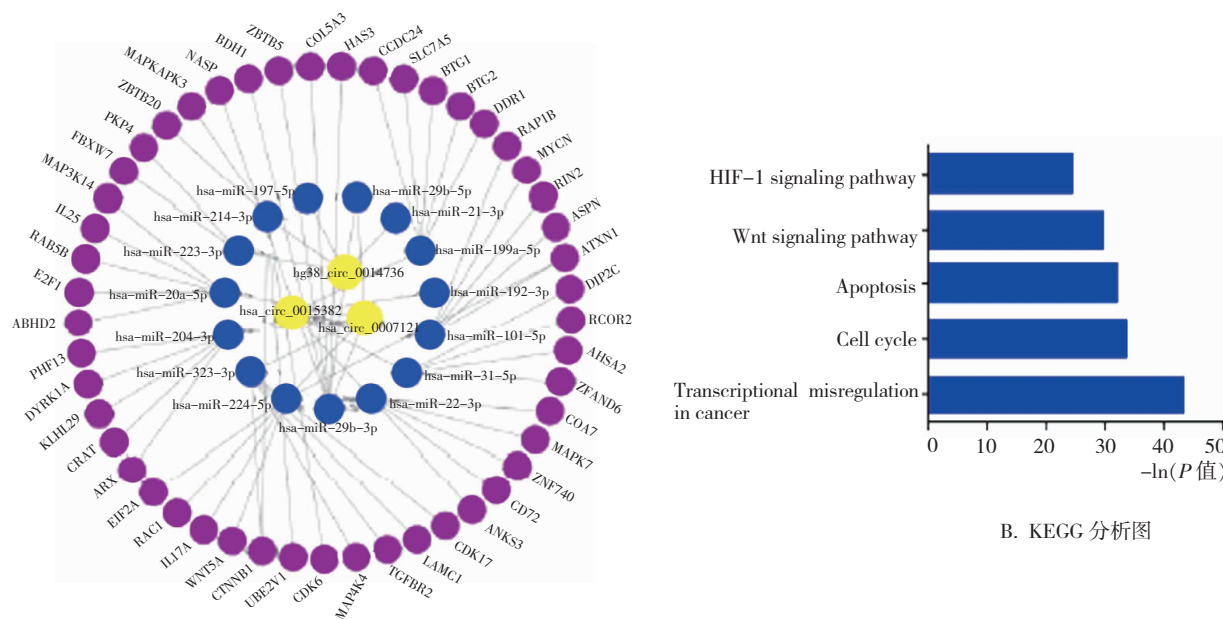


图3 差异 circRNA 的生物信息学分析

列中含有一个甚至多个某一 miRNA 的结合位点。已有的研究表明 circRNA 可通过结合位点与 miRNA 结合,可作为一种天然的、内源性的 miRNA 海绵^[8],抑制其对下游靶基因的调控作用,从而参与对细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭等功能的调控^[5-7,12-13,15]。基于竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA,ceRNA)学说^[23]的理论和以上研究,推测这 3 种差异 circRNA

也可能吸附某些特定的 miRNA,进而参与子痫前期的发病。而在本研究预测的可能吸附的 miRNA 中,miR-21 在子痫前期和胎儿宫内生长受限的胎盘组织中表达上调,且跟血管阻力增高相关^[24]。此外,miR-101 也被发现在调控子痫前期滋养细胞凋亡方面起重要作用^[25]。虽然其他预测的 miRNA 是否跟子痫前期发病相关尚需进一步研究,但 GO 分析显示受这些

miRNA 调控的基因跟转录后调节、增殖、缺氧应激有关。与此同时,跟子痫前期发病密切相关的通路包括 Wnt 信号通路^[26]、HIF-1 信号通路^[27]及凋亡通路^[28],在 KEGG 信号通路富集分析的结果中也出现明显富集现象,以上结果均提示 hsa_circ_0007121、hsa_circ_0015382 和 hg38_circ_0014736 可能在子痫前期的发病机制中起重要作用。

综上所述,鉴于 circRNA 在其他疾病所起的作用及生物信息学分析结果,本研究在子痫前期胎盘中检测并验证的差异 circRNA 可能参与了子痫前期的发病,并有望成为新的干预靶点。这一推测有待后续细胞功能实验和动物实验来进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratinam S, et al. Pre-eclampsia[J]. Lancet, 2016, 387(10022): 999–1011.
- [2] Redman C. The six stages of pre-eclampsia[J]. Pregnancy Hypertens, 2014, 4(3): 246.
- [3] Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, et al. Non-coding RNAs: regulators of disease[J]. J Pathol, 2010, 220(2): 126–139.
- [4] Sand M, Bechara FG, Sand D, et al. Circular RNA expression in basal cell carcinoma[J]. Epigenomics, 2016, 8(5): 619–632.
- [5] Zheng Q, Bao C, Guo W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple mirnas[J]. Nat Commun, 2016, 7: 11215.
- [6] Memczak S, Jens M, Eleftheriadi A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. Nature, 2013, 495(7441): 333–338.
- [7] Wang YH, Yu XH, Luo SS, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals that circular RNA 100783 is involved in chronic CD28-associated CD8⁺ T cell ageing[J]. Immun Ageing, 2015, 12: 17.
- [8] Shang X, Li G, Liu H, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals that hsa_circ_0005075, a new circular RNA biomarker, is involved in hepatocellular carcinoma development[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(22): e3811.
- [9] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2): 141–157.
- [10] Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(5): 453–461.
- [11] Li Y, Zheng Q, Bao C, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. Cell Res, 2015, 25(8): 981–984.
- [12] Chen L, Zhang S, Wu J, et al. CircRNA_100290 plays a role in oral cancer by functioning as a sponge of the miR-29 family[J]. Oncogene, 2017, 36(32): 4551–4561.
- [13] Xie H, Ren X, Xin S, et al. Emerging roles of circRNA_001569 targeting miR-145 in the proliferation and invasion of colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7: 26680–26691.
- [14] Li Y, Zheng F, Xiao X, et al. CircHIPK3 sponges miR-558 to suppress heparanase expression in bladder cancer cells[J]. EMBO Rep, 2017, 18(9): 1646–1659.
- [15] Han D, Li J, Wang H, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression[J]. Hepatology, 2017, 66(4): 1151–1164.
- [16] 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.
- [17] Du WW, Fang L, Yang W, et al. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(2): 357–370.
- [18] American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy[J]. Obstet Gynecol, 2013, 122(5): 1122–1131.
- [19] Cox B, Leavey K, Nosi U, et al. Placental transcriptome in development and pathology: expression, function, and methods of analysis[J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 213(4S): 138–151.
- [20] Qian Y, Lu Y, Rui C, et al. Potential significance of circular RNA in human placental tissue for patients with preeclampsia[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(4): 1380–1390.
- [21] Zhang YG, Yang HL, Long Y, et al. Circular RNA in blood corpuscles combined with plasma protein factor for early prediction of pre-eclampsia[J]. BJOG, 2016, 123(13): 2113–2118.
- [22] Maass PG, Glazár P, Memczak S, et al. A map of human circular RNAs in clinically relevant[J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(11): 1179–1189.
- [23] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?[J]. Cell, 2011, 146(3): 353–358.
- [24] Cindrova-Davies T, Herrera EA, Niu Y, et al. Reduced cystathionine γ -lyase and increased miR-21 expression are associated with increased vascular resistance in growth-restricted pregnancies: hydrogen sulfide as a placental vasodilator[J]. Am J Pathol, 2013, 182(4): 1448–1458.
- [25] Zou Y, Jiang Z, Yu X, et al. MiR-101 regulates apoptosis of trophoblast HTR-8/SVneo cells by targeting endoplasmic reticulum (ER) protein 44 during preeclampsia[J]. J Hum Hypertens, 2014, 28(10): 610–616.
- [26] Sonderegger S, Haslinger P, Sabri A, et al. Wingless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation[J]. Endocrinology, 2010, 151(1): 211–220.
- [27] Macklin PS, McAuliffe J, Pugh CW, et al. Hypoxia and HIF pathway in cancer and the placenta[J]. Placenta, 2017, 56: 8–13.
- [28] Longtine MS, Chen B, Odibo AO, et al. Villous trophoblast apoptosis is elevated and restricted to cytotrophoblasts in pregnancies complicated by preeclampsia, IUGR, or preeclampsia with IUGR[J]. Placenta, 2012, 33(5): 352–355.

(责任编辑:冉明会)