doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.01.007

特定环状 RNA 表达与衰老的关系研究 *

苗嘉峰[1] 马小艮[2] 裴 卓[3] 赵荣国[1] 李玉红[2△]

（1 陆军军医大学基础医学院四大队 重庆 400038；
2 陆军军医大学基础医学院细胞生物学教研室 重庆 400038；3 陆军军医大学基础医学院三大队 重庆 400038）

摘要 目的：研究小鼠不同组织器官中环状 RNA 的表达量在年老与年幼中的差异，揭示环状 RNA 与衰老的联系。**方法：**通过对不同组织器官的总 RNA 的提取，分别逆转录，并扩增 circUSP34、circTCF4、circTCF20、circZFP64、circPWWP2A、circLIN54，通过凝胶电泳比较其在年轻小鼠与年老小鼠的组织器官中的表达情况，明确上述环状 RNA 与衰老的联系。**结果：**环状 RNA 在不同年龄小鼠的组织器官中存在广泛性的差异性表达，不同组织不同环状 RNA 有着不同的表达量的改变，其与衰老存在联系。在卵巢中除 circTCF4，其余五种环状 RNA 表达量均与年龄负相关；在肾脏中，除 circTCF4 与 circPWWP2A，其余与年龄呈负相关；在乳腺中只有 circUSP3 与衰老呈负相关；而在肠道与生长相关的只有上述后三种环状 RNA，均呈正相关。其他样本与组织的发育阶段有不同的相关性，具体在结果体现。**结论：**环状 RNA 的表达量在组织中与年龄的增大有着显著相关性，环状 RNA 可能广泛地参与了不同的衰老通路，起到不同的生物学作用，其在衰老的产生中扮演重要角色。

关键词：环状 RNA；衰老；差异性表达

中图分类号：Q291；Q78；R339.38 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2019)01-31-07

Designation Circular RNA Expression and the Relationship with Aging*

MIAO Jia-feng[1], MA Xiao-gen[2], PEI Zhuo[3], ZHAO Rong-guo[1], LI Yu-hong[2△]

(1 Army Medical University, group 4, Chongqing, 400038, China; 2 Department of cell biology, Army Medical University, Chongqing, 400038, China; 3 Army Medical University, group 3, Chongqing, 400038, China)

ABSTRACT Objective: To study the difference in expression of circular RNA in different tissues at different ages mouses. **Methods:** Through the extraction of total RNA from different tissues. Next, Reverse transcription of primers respectively the circUSP34, circTCF4, circTCF20, circZFP64, circPWWP2A, circLIN54. Comparison of expression in tissues and organs of young and old mice by gel electrophoresis, the expression of the same primer amount along with the growth of the age had different change. The change of different organs is also different, so circular RNA may be involved in a wide mice with aged mice tissues and organs. **Results:** Circular RNA in different age existed wide differences in expression in the tissues and organs of mice. Different organization circular RNA has a different quantity expression change. It shows that are associated with aging. In the ovary except for circTCF4, the expression levels of the remaining five circular RNAs were negatively correlated with age. In the kidney, except circTCF4 and circPWWP2A, the rest was negatively correlated with age. Only circUSP3 was negatively correlated with aging in the mammary gland. Only the above-mentioned three kinds of circular RNAs have positive correlation between growth. There are different correlations between the developmental stages of other samples and the organs, See below for details. **Conclusions:** The expression of circular RNA has a significant correlation between the increase in age in tissues. Circular RNA may be widely involved in different aging pathways and play different biological roles. They play the important role in the generation of aging.

Key words: Circular RNA; Aging; Differences in expression

Chinese Library Classification(CLC): Q291; Q78; R339.38 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)01-31-07

前言

环状 RNA 是目前研究的热点，它是一种共价闭环结构的新型长链非编码型 RNA，没有 5' 和 3' 的极性结构[1]，在自然界人类，动物甚至是植物中的真核细胞中均有很高的表达。研究表明环状 RNA 在哺乳动物细胞中广泛存在，其具有内源性以及很高的稳定性，没有极性结构给予其对 RNase 的抗性[2]。在 20 世纪后期，环状 RNA 被认为是异常剪切或者偶然产生的 RNA 产物。随着 RNA 高通量测序技术的进步以及生物技术科学的发展，人们开始重视并增加环状 RNA 的研究。最近的研究表明，环状 RNA 可作为竞争性内源性 RNA 与 miRNA 海绵吸附作用，在转录后水平上对基因表达进行调控，调节转录与剪

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81472895）；高等学校大学生创新创业训练计划（2090031036）

作者简介：苗嘉峰（1996-），本科，主要研究方向：环状 RNA，E-mail: 2819503866@qq.com

△通讯作者：李玉红（1980-），研究生导师，副教授，主要研究方向：干细胞与再生医学，E-mail: liyuhong@tmmu.edu.cn，电话：18623179680

（收稿日期：2018-04-27 接受日期：2018-05-24）

切、结合相关蛋白等重要生物学作用[3]。

很大程度上环状 RNA 的功能还不确定,据报道环状 RNA 均有与生物体年龄相关的表达状况,很大程度上参与了衰老的发生。有研究显示在小鼠神经元中环状 RNA 的表达有随年龄增大而上升的趋势[4]。还有报道在猴的骨骼肌中随着年龄的增长具有差异性的表达[5]。环状 RNA 具有细胞类型特异性、组织特异性或发育阶段特异性表达,在不同的组织中,环状 RNA 的表达情况不同,参与广泛的生物生长,同时参与不同疾病的进程[6]。环状 RNA 参与包括 CDK2 在内如 p21、胰岛素信号通路、Wnt 和 β -catenin 通路。这些环状 RNA 有能力影响生物体的多种细胞反应[7]。这些提示环形 RNA 在同器官组织衰老有很大关联。本研究摘要中提到的环状 RNA 在表皮干细胞和已分化的表皮细胞中的表达量存在差异。可以推断,不同分化程度的细胞可以作为具有不同衰老程度的细胞,这些分子与细胞的衰老有关。

故本研究的目的在于研究上述环状 RNA 的表达水平与不同生长阶段组织器官的差异性,推测其是否与组织器官的衰老有一定的关系,为后续的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

C57 野生型健康雌鼠,3 月龄、18 月龄小鼠各三只。

1.2 主要试剂及主要仪器

1.2.1 主要试剂 RT-PCR 逆转录试剂盒(ToYoBo 公司),2× Taq Master Mix(novoprotein 公司),DNA Marker I(Biomed 公司),提取总 RNA 试剂盒(上海普洛麦格公司)。

1.2.2 主要仪器 PCR 仪(BIO-RAD),紫光分光光度仪(BECKMAN COULTER 公司),凝胶成像系统(BIO-RAD)。

1.3 方法

1.3.1 提取小鼠组织 将小鼠分为两组,每组各三只,一组为 3 月龄小鼠,另一组为 18 月龄小鼠。两组剪取组织方法一致。具体操作如下,将小鼠断颈处死后开颅取下脑组织置于液氮。备皮后剪开背部皮肤,作一左侧斜切口,暴露小鼠脾脏与左肾,于右侧对称位置作另一斜切口暴露右肾,取下完整背皮、脾脏、两肾,去除多余血管结缔组织,置于液氮中。将小鼠翻面沿腹白线剪开皮肤暴露腹腔盆腔,分离肝脏(摘除胆囊),分离小肠约小肠总长的五分之三。取第四对乳腺以及卵巢,向上继续分离皮肤,剪开胸腔摘除小鼠心脏、肺脏。剪开大腿皮肤取肌肉组织。以上组织均立即置于液氮中,全程操作迅速,保证组织新鲜。

1.3.2 提取总 RNA 采用上海普洛麦格生物产品有限公司试剂盒方法提取总 RNA。

1.3.3 RT-PCR 按照逆转录试剂盒方法进行逆转录得到 cDNA。引物设计及长度见表 1。PCR 反应体系:2× Taq-Mix 混合液 6.3 μL,ddH_2O 3.2 μL,cDNA 1 μL,引物各 1 μL,合计 12.5 μL。反应条件:94℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 30 s,按各引物退火温度 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共循环 37 次。加扩增产物 5 μL 到 1 %琼脂糖凝胶 100 V 电泳,紫外凝胶成像仪拍照。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 6.0 进行方差分析,实验结果采用 mean ± SD 表示,使用 t-text 进行差异性检测,$P<0.05$ 表示具有显著性差异($P<0.05$ 用 "*" 表示,$P<0.01$ 用 "**" 表示)。

2 结果

2.1 年老年轻小鼠不同器官 circUSP3 表达

circUSP3 在年轻小鼠中,直观来看各组织有较高的表达量;在 18 月龄小鼠中,乳腺、卵巢、骨骼肌与肝脏中表达量低。通过统计学得知,在小鼠心脏、肾脏、乳腺、卵巢、骨骼肌、肝脏、肺脏中随着年龄的增加,circUSP3 表达量显著下降($P<0.01$)。而 circUSP3 在脾脏中的表达量与年龄成显著正相关($P<0.001$)。

2.2 年老年轻小鼠不同器官 circTCF4 表达

circTCF4 在两组小鼠中表达均不是很强,但广泛存在。在小鼠心脏,神经元,脾脏中与年龄成显著正相关($P<0.001$).而在骨骼肌中显著负相关($P<0.001$)。

表 1 本实验使用的 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers used in this study

Name	Primer sequences(5'-3')	Linear
cirUSP3	F: CCATTCACATACTGTGCAGGTCC R: TCCCATTCCTTAACTCCACAGC	249
cirTCF20	F: GCTTTGCTCCCGAAACGAC R: TGGGTCCATGAGGGTTGTATT	159
cirZFP644	F: CTTTAGCACCAGTAATGTCGGT R: CAGTCCGTTGATCTATCAGCCA	124
cirLIN54	F: CTCCATGATCGCACCGCTTC R: TCACAGGTAGGGTTCTTTCACAG	187
cirPWWP2A	F: GCCTAAGCCGCAGTCTCG R: GGAGAGAGGTCATCGGGAAC	191
cirTCF4	F: CCTCCGGGTTTGCCGTCTT R: CGGCGGGCATTATTGCTTGA	125
β -actin	F: TGCTGTCCCTGTATGCCTCT R: TTGATGTCACGCACGATTTC	223

Note: F, forward; R, reverse.

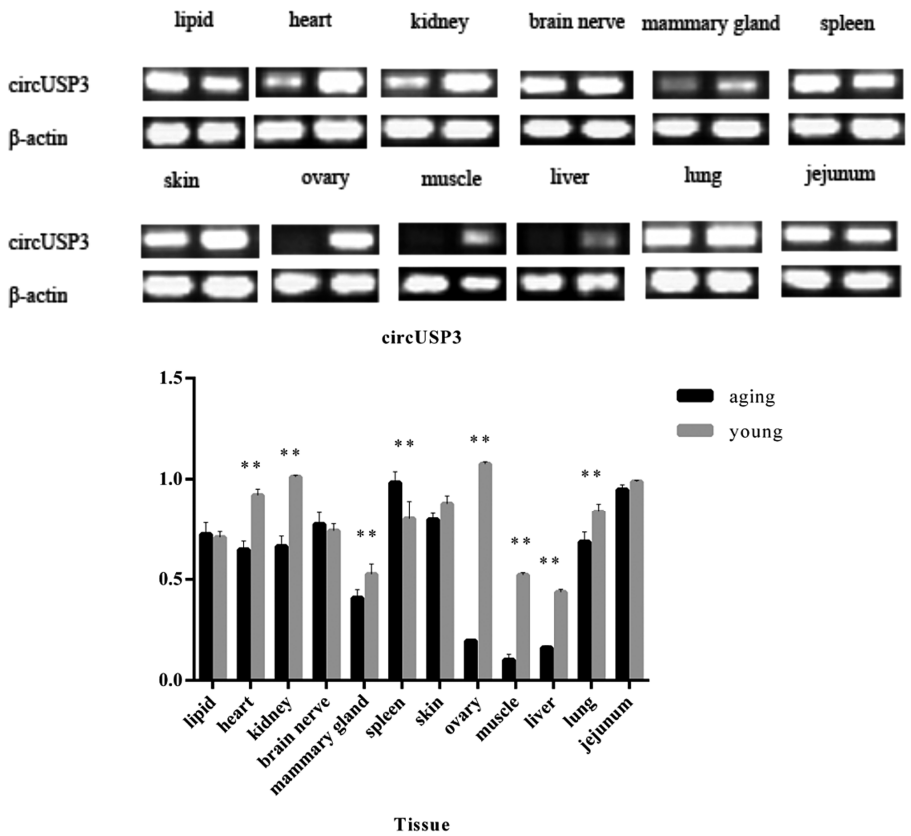

图 1 circUSP3 在各组织中表达情况与 β-actin 标准化后的比较(每组样本第一条带为 18 月龄老鼠,第二条带为 3 月龄老鼠)

Fig.1 Expression of circUSP3 compare in various tissues and organs which after the standardization of β-actin (The first one in each group is an 18-month-old mouse and the second is a 3-month-old mouse)

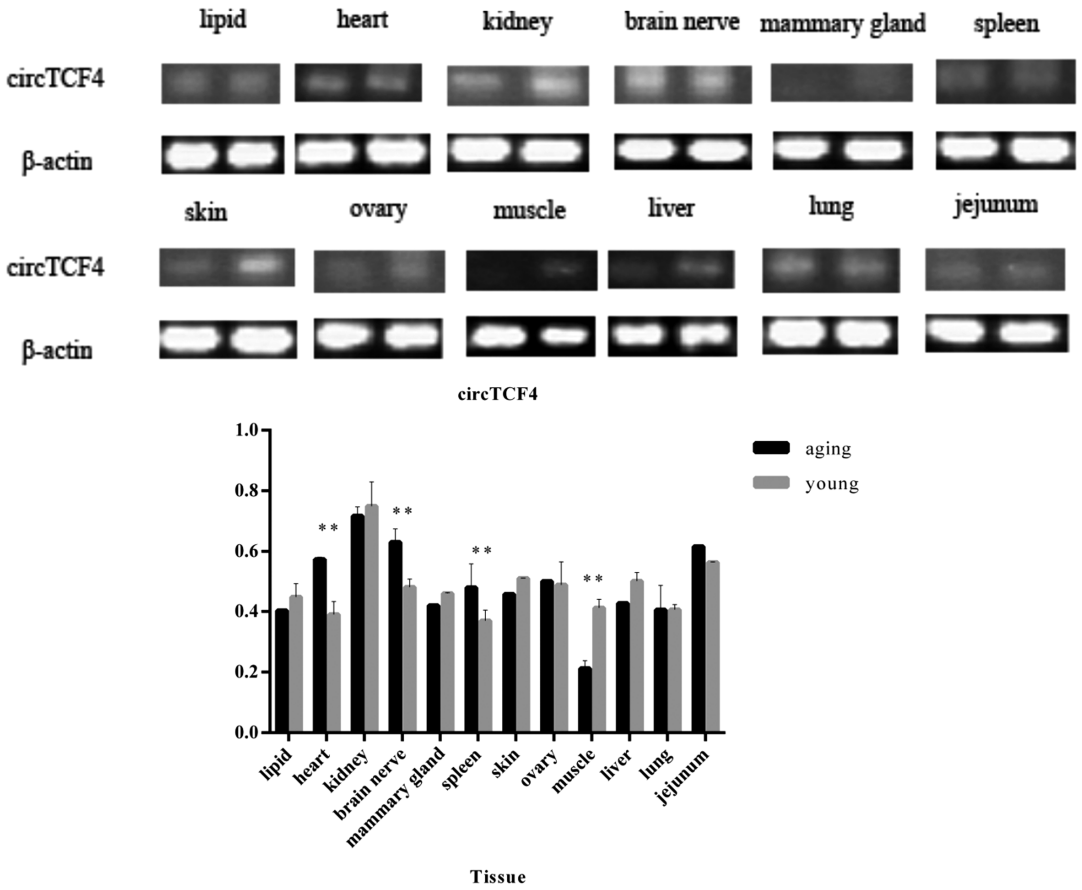

图 2 circTCF4 在各组织中表达情况与 β-actin 标准化后的比较(每组样本第一条带为 18 月龄老鼠,第二条带为 3 月龄老鼠)

Fig.2 Expression of circTCF4 compare in various tissues and organs which after the standardization of β-actin (The first one in each group is an 18-month-old mouse and the second is a 3-month-old mouse)

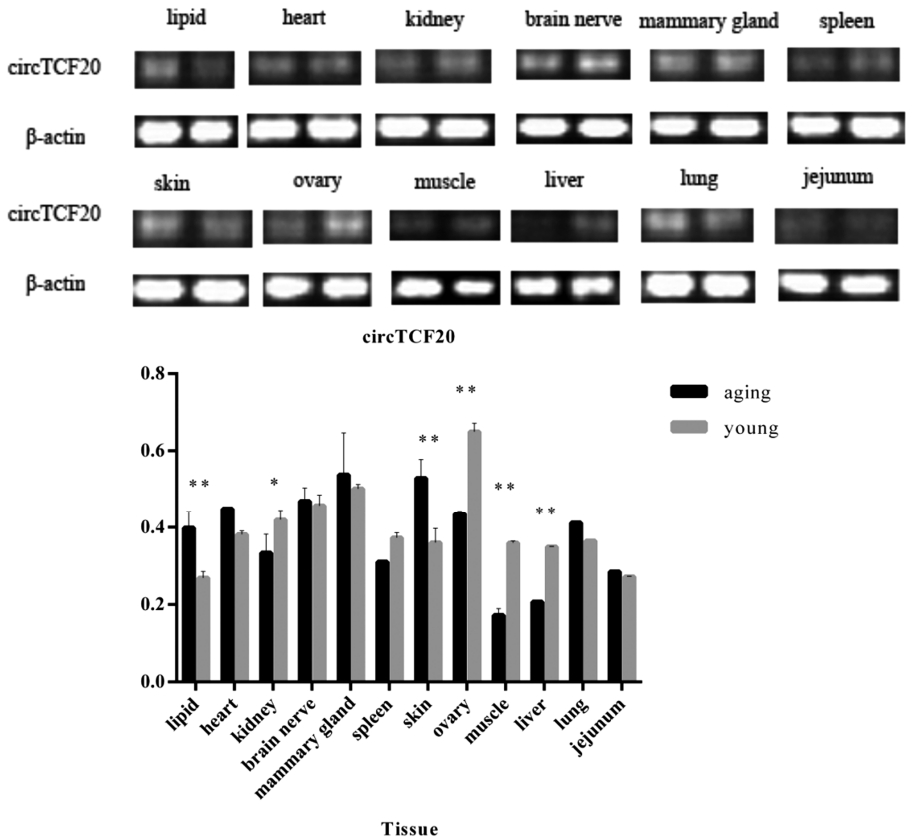

图 3 circTCF20 在各组织中表达情况与 β-actin 标准化后的比较(每组样本第一条带为 18 月龄老鼠,第二条带为 3 月龄老鼠)

Fig.3 Expression of circTCF20 compare in various tissues and organs which after the standardization of β-actin (The first one in each group is an 18-month-old mouse and the second is a 3-month-old mouse)

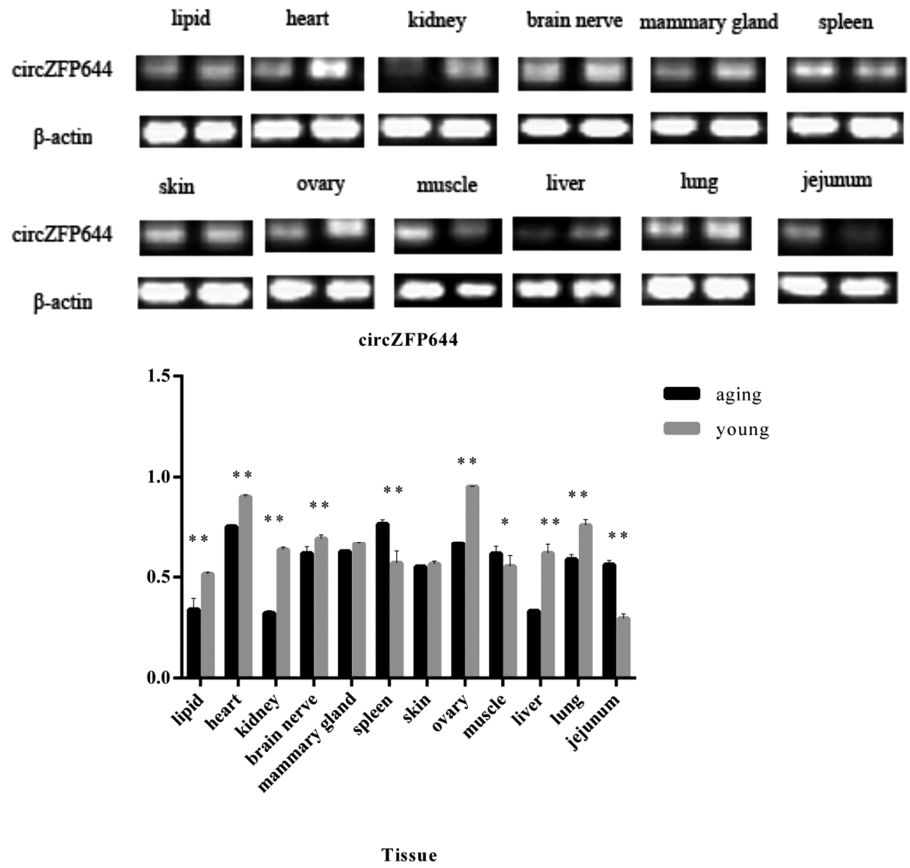

图 4 circZFP644 在各组织中表达情况与 β-actin 标准化后的比较(每组样本第一条带为 18 月龄老鼠,第二条带为 3 月龄老鼠)

Fig.4 Expression of circZFP644 compare in various tissues and organs which after the standardization of β-actin (The first one in each group is an 18-month-old mouse and the second is a 3-month-old mouse)

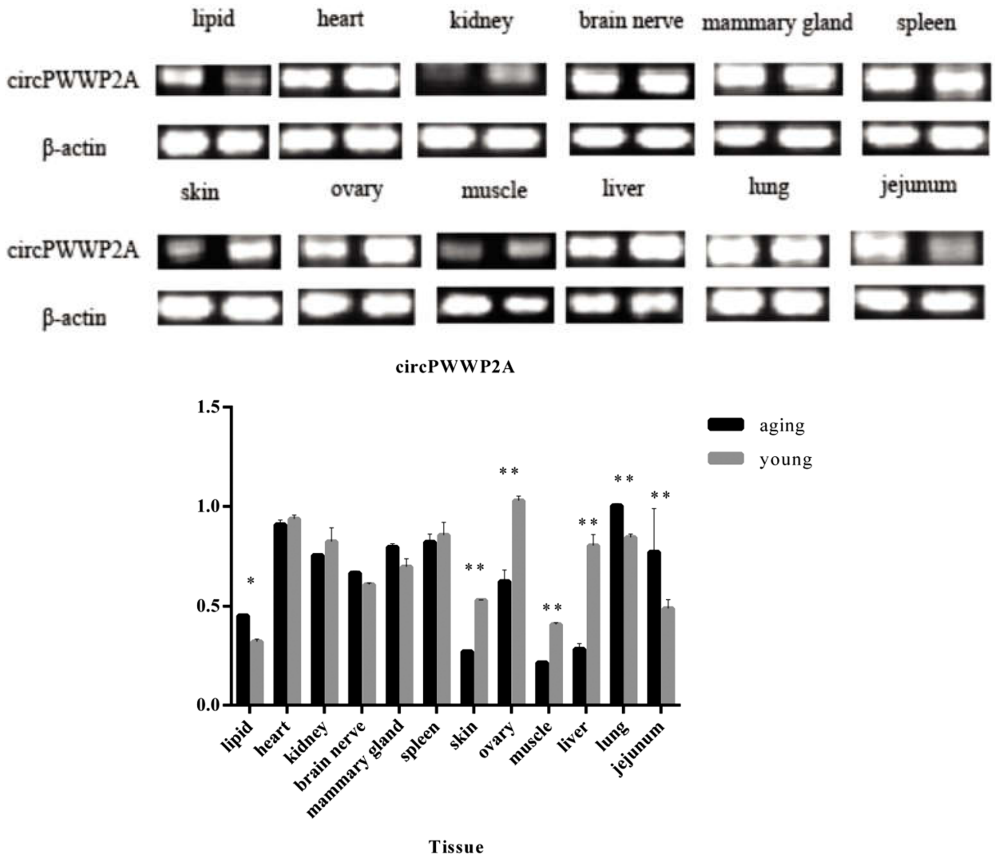

图 5 circPWWP2A 在各组织中表达情况与 β-actin 标准化后的比较(每组样本第一条带为 18 月龄老鼠,第二条带为 3 月龄老鼠)

Fig.5 Expression of circPWWP2A compare in various tissues and organs which after the standardization of β-actin (The first one in each group is an 18-month-old mouse and the second is a 3-month-old mouse)

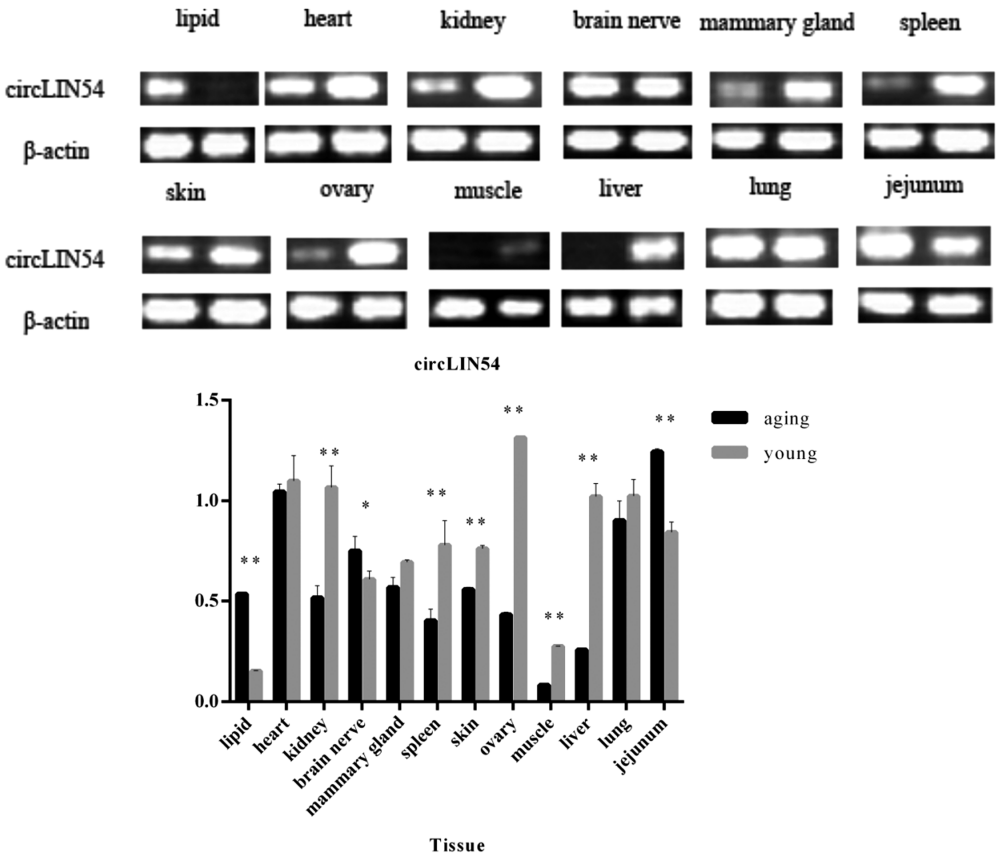

图 6 circLIN54 在各组织中表达情况与 β-actin 标准化后的比较(每组样本第一条带为 18 月龄老鼠,第二条带为 3 月龄老鼠)

Fig.6 Expression of circLIN54 compare in various tissues and organs which after the standardization of β-actin (The first one in each group is an 18-month-old mouse and the second is a 3-month-old mouse)

2.3 年老年轻小鼠不同器官 circTCF20 表达

circTCF20 在年轻小鼠中各组织表达强烈，而在老年雌鼠的卵巢、骨骼肌、肝脏中含量很低。circTCF20 在脂肪组织，皮肤中与衰老呈显著正相关（*P<0.001*），在肾脏、卵巢、骨骼肌、肝脏中呈显著负相关（*P<0.05*）。

2.4 年老年轻小鼠不同器官 circZFP644 表达

circZFP644 在两组小鼠中表达不是很强烈。根据统计学得知其在脂肪组织、心脏、肾脏、神经元、卵巢、肝脏与肺脏中存在与衰老呈现显著负相关（*P<0.001*）。在脾脏、骨骼肌、肠道中与衰老呈现显著正相关（*P<0.05*）。

2.5 年老年轻小鼠不同器官 circPWWP2A 表达

circPWWP2A 在两组小鼠中除肾脏与骨骼肌外表达都比较强烈，而在脂肪与肠道中 18 月龄小鼠的含量跟高，而在皮肤中相反。通过统计学方法在脂肪组织、肺脏、肠道中与衰老存在显著正相关（*P<0.05*）。在皮肤、卵巢、骨骼肌、肝脏中呈现显著负相关（*P<0.01*）。

2.6 年老年轻小鼠不同器官 circLIN54 表达

circLIN54 表达量在两组中差异较大，在年老小鼠的骨骼肌与肝脏中几乎不可见，在 3 月龄小鼠脂肪组织中几乎不可见。根据统计，在脂肪组织、神经元、肠道中与衰老呈现显著正相关（*P<0.05*）。在肾脏、脾脏、皮肤、卵巢、骨骼肌与肝脏中呈现显著负相关（*P<0.001*）。

3 讨论

器官组织的衰老受到多种因素的调节。环状 RNA 参与多种细胞通路，有着强大的生物学功能。本文通过多种环状 RNA 在两种生长阶段的表达量为起点，探究环状 RNA 与衰老之间的联系。根据研究结果，上述所选的六组环状 RNA 的表达量在广泛的组织器官中存在随生长时间而改变的差异性，这对于之前的假设有肯定意义。

circUSP3 的表达量与衰老有明显联系，其线性分子 USP 3 是泛素特异性蛋白酶家族的成员之一。USP3 能够去泛素化和稳定 p53，同时促进正常细胞转化[8]。在沉默 USP 3 的细胞中，可以观察到 DNA 损伤的积累、S 期延迟和 ATR/ATM 调节的检查点反应的激活[9]。circUSP3 只有在脾脏中与年龄呈现正相关，其余为负相关。脾脏参与机体的免疫和造血，尤其是免疫功能，含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞，通过多种机制发挥抗肿瘤作用。研究表明，缺乏 USP 3 的小鼠寿命明显缩短，造血系统癌症发生率增强[10]。circUSP3 在脾脏中的表达量变化可能表明对机体肿瘤的发生和转归有关，以及在机体免疫方面起到重要作用。

在对 circLIN54 的研究中，其线性分子 LIN 54 在细胞周期基因的调控中起着重要的作用。LINK54 是 LINC 的核心亚基，LINC 通过在 G0/G1 和 S 期结合到 p130/E2F4/DP1 而参与细胞周期进程。LIN54 是人类细胞增殖所必需的蛋白[11]。LIN54 在肺、脑、肠等组织中表达较为丰富，另一方面，LIN54 在非增生组织中如肌肉中的表达较低[12]。在研究中发现 circLIN54 在神经元与肠道中表达丰富，随年龄的增加而增加，在骨骼肌中表达量很低，这与之前的报道相吻合。同时在卵巢，肾脏，肝脏中年轻与年老小鼠的表达量存在非常大的差异，该分子可能对器官的生长以及成熟起到重要作用。

circPWWP2A 可以发现其在骨骼肌中表达量很低，线性分子对 H2A.Z 的表达有影响，在 HeLa 细胞导致有丝分裂进展缺陷，以及对胚胎的正常发育有影响[13]。说明 PWWP2A 对细胞的有丝分裂和原始细胞发挥重要作用，circPWWP2A 在非增殖组织肌肉中含量低，而在其他器官中均有较高的表达。在皮肤，卵巢，肝脏中年老小鼠表达有显著下降，可能机体衰老时基础代谢率的下降与 circPWWP2Aa 有关。有研究显示 ZFP644 与神经发育或紊乱有潜在的相关性 [14]。 circZFP644 在神经元早期生长发育时表达量较高，可能对神经元的生长发育有促进作用，而在年老小鼠神经元中含量显著下降，是否与脑部疾病的发生发展具有潜在联系，是一个值得研究的方向。

circTCF20 在很多器官与组织表达量均不是很高，在脂肪组织以及皮肤中的含量随着年龄的增长而增加，而在肾脏、卵巢、肝脏及骨骼肌中则相反，其线性分子 TCF20（转录因子 20），参与 MMP3 蛋白启动子的转录激活[15]，MMPs 活化信号传导有引起细胞生物学反应的重要作用。可能其环状分子也同样参与其中，广泛地参与多种细胞通路。此外，circTCF20 在卵巢与乳腺中的表达量较高，可能与机体内分泌有关。TCF4（转录因子 4）广泛表达于发育中的神经系统的哺乳动物。它主要控制神经元和胶质母细胞的增殖和分化[16]。在之前的研究中可以发现其环状分子在年老小鼠的神经元中表达量更高，我们可以猜想是否 circTCF4 的表达量具有一个阈值，阈值以内则可以促进神经系统的生长发育，超出阈值则出现相反功能。TCF4 基因位于 18 号染色体上，编码螺旋环螺旋转录因子 E2-2[17]。其在小鼠中其单倍体计量不足可影响基因表达和大脑 DNA 的甲基化[18]。Wnt/β-catenin 信号通路在调控细胞的生长、运动、分化中起到重要作用，研究表明，β-catenin 可以形成 β-catenin/TCF4 复合物，进而转录激活 cyclin D1 基因的表达[19]。在骨骼肌中我们发现年轻小鼠的表达量更多，其可能对于骨骼肌的生长起到促进作用。

环状 RNA 具有对微小 RNA 的海棉吸附作用。人 CDR 1as 在斑马鱼中脑发育中的表达受损，类似于敲除 miR-7，表明 CDR1as 是一种 miRNA 拮抗剂，其与 miRNA 的结合能力是已知转录本的 10 倍，这证实了环状 RNA 具有海绵吸附作用[20]。最著名的环状 RNA 是对于从 SRY(性别决定区 Y)位点转录的 miRNA 的吸附，并且在睾丸中高表达[21]。上述 6 组实验中可以发现，有多组环状 RNA 在神经元中的分布同年龄和大脑的发育有显著联系，这同先前的报道相符，或许可以提供一种新的思路 -- 神经元的发育与环状 RNA 联系密切。

某些环状 RNA 在大脑和非分裂细胞中非常丰富，许多还表现出生理特异性和组织特异性表达。最近的研究证明环状 RNA 是具有多种功能的，例如某些环状 RNA 与癌症存在联系。环状RNA 在突触中高度富集，其水平受到神经元活动的调节[22]。某些环状 RNA 通过调节宿主基因的 mRNA 表达来调控顺式核糖核酸的基因表达；其他环状 RNA 的功能是相反的[21]。同样的，一些环状 RNA 可能与跨膜因子结合，参与肌肉的发育[23]。

综上,环状 RNA 与衰老有着明显的联系,其参与了不同的通路,产生了不同的作用。本研究从各个环状 RNA 的表达量着手,选取两组年龄的小鼠做对照,观察其表达量的多寡,证实了其与衰老的关系,但本次研究还有不足之处,选取的样本可能存在个体差异, 同样的单从表达量的多寡无法揭示环状 RNA 的生物学功能,需要通过进一步的研究去验证之前的猜想。

参 考 文 献(References)

[1] Chen L, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis[J]. RNA Biology, 2015, 12(4): 381-388

[2] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs[J]. Cancer Letters, 2015, 365(2): 141-148

[3] Qu S, Zhong Y, Shang R, et al. The emerging landscape of circular RNA in life processes[J]. RNA Biology, 2016, 14(8): 992-999

[4] Gruner H, Cortés-López M, Cooper D A, et al. CircRNA accumulation in the aging mouse brain[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1)

[5] Abdelmohsen K, Panda A C, De S, et al. Circular RNAs in monkey muscle: age-dependent changes[J]. Aging (Albany NY), 2015, 7(11): 903-910

[6] Qu S, Zhong Y, Shang R, et al. The emerging landscape of circular RNA in life processes[J]. RNA Biology, 2016, 14(8): 992-999

[7] Maiese K. Disease onset and aging in the world of circular RNAs[J]. HHS Public Access, 2016, 2(6): 327-329

[8] Fu S, Shao S, Wang L, et al. USP3 stabilizes p53 protein through its deubiquitinase activity [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 492(2): 178-183

[9] Nicassio F, Corrado N, Vissers J H A, et al. Human USP3 Is a Chromatin Modifier Required for S Phase Progression and Genome Stability[J]. Current Biology, 2007, 17(22): 1972-1977

[10] Wang Z, Yang J, Di J, et al. Downregulated USP3 mRNA functions as a competitive endogenous RNA of SMAD4 by sponging miR-224 and promotes metastasis in colorectal cancer [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4281

[11] Schmit F, Cremer S, Gaubatz S. LIN54 is an essential core subunit of the DREAM/LINC complex that binds to the cdc2 promoter in a sequence specific manner[J]. FEBS J, 2009, 276(19): 5703-5716

[12] Matsuo T, Kuramoto H, Kumazaki T, et al. LIN54 harboring a mutation in CHC domain is localized to the cytoplasm and inhibits cell cycle progression[J]. Cell Cycle, 2014, 11(17): 3227-3236

[13] Link S, Hake S B. PWWP2A: A novel mitosis link?[J]. Cell Cycle, 2017, 16(20): 1849-1850

[14] Steine I M, Zayats T, Stansberg C, et al. Implication of NOTCH1 gene in susceptibility to anxiety and depression among sexual abuse victims[J]. Translational Psychiatry, 2016, 6(12): e977

[15] Sagar Ramesh Darvekar J E H B. SPBP Is a Sulforaphane Induced Transcriptional Coactivator of NRF2 Regulating Expres sion of the Autophagy Receptor p62/SQSTM1 [J]. PLOS ONE, 2014, 9 (1): e85262

[16] Alizadeh F, Tavakkoly-Bazzaz J, Bozorgmehr A, et al. Association of transcription factor 4 (TCF4) gene mRNA level with schizophrenia, its psychopathology, intelligence and cognitive impairments[J]. J Neurogenet, 2017, 31(4): 344-351

[17] Abraham Kuot A W H G, Richard Mills J E C K. TGC repeat expansion in the TCF4 gene increases the risk of Fuchs'endothelial corneal dystrophy in Australian cases [J]. PLOS ONE, 2017, 12(8): e183719

[18] Marc P. Forrest M J H D, Blake D J. The Psychiatric Risk Gene Transcription Factor 4 (TCF4) Regulates Neurodevelopmental Pathways Associated With Schizophrenia, Autism, and Intellectual Disability[J]. Schizophrenia Bulletin, 2018, 44(5): 1100-1110

[19] Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications [J]. Exp Mol Med, 2006, 38(1): 1-10

[20] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. Nature, 2013, 495 (7441): 333-338

[21] Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495(7441): 384-388

[22] Mor Hanan H S A S. CircRNAs in the brain[J]. RNA BIOL, 2017, 14 (8): 1028-1034

[23] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis [J]. Molecular Cell, 2017, 66(1): 22-37

(上接第 73 页)

[27] Steven M, Faust S, Subraman R. Plaque disclosing dentifrice compositions with semisolid microcapsules of dye [P]. US: 4348378, 1982

[28] Lerner S. Plaque disclosing agent dispensing toothbrush: US, US6371674[P]. 2002

[29] Lerner S, Lerner S, Arbiser U. Microbes detecting and treating toothbrush: WO, US8636433[P]. 2014

[30] Gatzemeyer J J, Boyd T J, Jimenez E J, et al. Oral care implement having fluid delivery system: US, US8920168[P]. 2014

[31] 李刚. 牙面菌斑检测方法的发展和应用 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2003, 13(6): 352
Li Gang. Development and Methods of Appliance on Plaque Recording and Measuring of Tooth Surface [J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2003, 13(6): 352

[32] 吴春梅, 朱海燕. 菌斑控制方法及控制相关因素[J]. 中国伤残医学, 2013(11): 179-180
Wu Chun-mei, Zhu Hai-yan. Plaque controlling method and related factors [J]. Chinese Journal of Trauma and Disability Medicine, 2013 (11): 179-180