

# 干扰 hsa\_circ\_0103232 对葡萄膜黑色素瘤细胞生物学行为的影响

杨莹 魏文斌

首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 眼内肿瘤诊治研究北京市重点实验室  
北京市眼科学与视觉科学重点实验室 医学人工智能研究与验证工信部重点实验室, 北京  
100730

通信作者: 魏文斌, Email: weiwenbintr@163.com

**【摘要】** 目的 探讨干扰 hsa\_circ\_0103232 对葡萄膜黑色素瘤 C918 和 MUM2B 细胞增殖、迁移、细胞周期及凋亡的影响。方法 培养 C918 和 MUM2B 细胞株, 通过实时荧光定量 PCR 分别检测 3 个靶向 hsa\_circ\_0103232 的小干扰 RNA (siRNA) 的干扰效果, 并选择干扰效果最好的 siRNA 进行后续实验。将 C918 和 MUM2B 细胞均分为阴性对照转染 (siCtrl) 组和干扰 (si-hsa\_circ\_0103232) 组, 采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 和细胞克隆形成实验检测细胞增殖情况; 采用 Transwell 实验检测细胞迁移情况; 采用流式细胞术检测细胞周期分布和细胞凋亡情况; 采用荧光原位杂交实验检测 hsa\_circ\_0103232 在细胞中的定位。结果 实时荧光定量 PCR 结果显示, 3 个靶向 hsa\_circ\_0103232 的 siRNA 中, 以 si-hsa\_circ\_0103232#1 的靶点效果最好, 在 C918 和 MUM2B 细胞中的干扰后表达水平分别为  $0.263 \pm 0.016$  和  $0.469 \pm 0.028$ , 显著低于对照组的  $1.013 \pm 0.008$  和  $1.004 \pm 0.108$  (均  $P < 0.001$ )。CCK-8 结果显示, 与 siCtrl 组相比, si-hsa\_circ\_0103232 组 C918 和 MUM2B 细胞增殖活力在转染后不同时间均显著降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 细胞克隆形成实验结果显示, si-hsa\_circ\_0103232 组 C918 和 MUM2B 细胞形成克隆数分别为  $(12 \pm 1)$  和  $(45 \pm 7)$  个, 分别少于 siCtrl 组的  $(28 \pm 4)$  和  $(83 \pm 3)$  个, 差异均有统计学意义 ( $t = 4.93, 7.42$ , 均  $P < 0.05$ ); Transwell 实验结果显示, si-hsa\_circ\_0103232 组 C918 和 MUM2B 细胞迁移数量分别为  $(4 \pm 1)$  和  $(24 \pm 2)$  个, 分别少于 siCtrl 组的  $(37 \pm 12)$  和  $(57 \pm 3)$  个, 差异均有统计学意义 ( $t = 3.91, 10.80$ , 均  $P < 0.05$ ); 流式细胞术检测结果显示, 与 siCtrl 组相比, si-hsa\_circ\_0103232 组 C918 和 MUM2B 细胞中 G1 期细胞的比例均明显升高, G2/M 期比例均显著下降, 细胞凋亡率均显著升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 荧光原位杂交实验结果显示, hsa\_circ\_0103232 在 C918 和 MUM2B 细胞中定位在细胞核。结论 干扰 hsa\_circ\_0103232 可抑制 C918 和 MUM2B 细胞增殖、迁移和周期进程, 并促进细胞凋亡。hsa\_circ\_0103232 可能成为葡萄膜黑色素瘤新的治疗靶点。

**【关键词】** 葡萄膜黑色素瘤; 环状 RNA; 小干扰 RNA; 治疗靶点

**基金项目:** 国家自然科学基金 (82002883、82220108017、82141128); 首都卫生发展科研专项 (首发 2020-1-2052); 北京市科委科技计划项目 (Z201100005520045、Z181100001818003); 首都医科大学附属北京同仁医院 2020 青年人才培养计划种子基金 (2020-YJJ-ZZL-017)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20231122-00179

## Effect of interfering hsa\_circ\_0103232 on the biological behavior of uveal melanoma cells

Yang Xuan, Wei Wenbin

Beijing Tongren Eye Center, Beijing Key Laboratory of Intraocular Tumor Diagnosis and Treatment, Beijing Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Medical Artificial Intelligence Research and Validation Key Laboratory of the Ministry of Industry and Information Technology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

Corresponding author: Wei Wenbin, Email: weiwenbintr@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of interference with hsa\_circ\_0103232 on the proliferation, metastasis, cell cycle and apoptosis of melanoma cells C918 and MUM2B. **Methods** C918 and MUM2B cells were cultured, and the interference efficiency of three small interfering RNA (siRNA) targeting hsa\_circ\_0103232 were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR). The siRNA with the highest interference efficiency was used for the following experiment. Both C918 and MUM2B cells were divided into negative control transfection (siCtrl) groups and interference (si-hsa\_circ\_0103232) groups. The proliferation of C918 and

MUM2B cells was examined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay and cell colony formation assay. The migration of C918 and MUM2B cells was determined by transwell assay. The cell cycle distribution and apoptosis rate of C918 and MUM2B cells were detected by flow cytometry. The localization of hsa\_circ\_0103232 in C918 and MUM2B cells was tested by the fluorescence in situ hybridization experiment (FISH). **Results** The results of real-time quantitative PCR showed that among the three siRNAs targeting hsa\_circ\_0103232, si-hsa\_circ\_0103232#1 had the best effect, which reduced the expression level of gene in C918 and MUM2B cells to  $0.263 \pm 0.016$  and  $0.469 \pm 0.028$ , significantly lower than  $1.013 \pm 0.008$  and  $1.004 \pm 0.108$  of control groups (both at  $P < 0.001$ ). CCK-8 results showed that the proliferation activity of C918 and MUM2B cells was significantly lower in si-hsa\_circ\_0103232 group than in siCtrl group after transfection (all at  $P < 0.05$ ). The results of cell clone formation showed that the clone number of C918 and MUM2B cells in si-hsa\_circ\_0103232 group were  $12 \pm 1$  and  $45 \pm 7$ , which were significantly lower than  $28 \pm 4$  and  $83 \pm 3$  in siCtrl group, and the differences were statistically significant ( $t = 4.93, 7.42$ ; both at  $P < 0.05$ ). Transwell assay results showed that the number of migrating C918 and UM2B cells in si-hsa\_circ\_0103232 group were  $4 \pm 1$  and  $24 \pm 2$ , respectively, which were significantly lower than  $37 \pm 12$  and  $57 \pm 3$  in siCtrl group, and the differences were statistically significant ( $t = 3.91, 10.80$ ; both at  $P < 0.05$ ). The results of flow cytometry showed that compared with siCtrl group, the proportion of G1 phase cells in C918 and MUM2B cells in si-hsa\_circ\_0103232 group increased significantly, the proportion of G2/M phase cells decreased significantly, and the number of apoptotic cells increased significantly (all at  $P < 0.05$ ). FISH experiment showed that hsa\_circ\_0103232 was located in the nuclei of C918 and MUM2B cells. **Conclusions** Interference with hsa\_circ\_0103232 can inhibit the proliferation, migration and cycle progression of C918 and MUM2B cells, and promote their apoptosis. hsa\_circ\_0103232 may be a new therapeutic target for uveal melanoma.

[Key words] Uveal melanoma; RNA, circular; RNA, small interfering; Therapeutic target

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (82002883, 82220108017, 82141128); The Special Project of Capital Health Research and Development (2020-1-2052); Science & Technology Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission (Z201100005520045, Z181100001818003); The Priming Scientific Research Foundation for the Junior Researcher in Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University (2020-YJJ-ZZL-017)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20231122-00179

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UM) 是成年人常见的原发性眼内恶性肿瘤,具有恶性程度高、发病隐匿的特点,严重威胁患者的视力乃至生命安全。UM 起源于眼球壁的中间葡萄膜层,包括虹膜、睫状体及脉络膜,具有高度侵袭性,约 50% 的患者会出现转移性 UM<sup>[1-4]</sup>。目前,对于 UM 缺乏有效的治疗手段,患者的预后和生存率较差,UM 发生转移后整体的生存时间为 10~12 个月<sup>[5-6]</sup>。因此,深入了解 UM 的分子机制,进而确定更有效的生物标志物和治疗靶点,对其早期临床诊断、制定预防和治疗策略具有重要意义。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一种新型内源性非编码 RNA,被认为是哺乳动物中一类稳定的调节转录物<sup>[7-8]</sup>。circRNA 由“反向剪接”反应产生,具有特征性的共价闭环结构,并且在特定细胞类型或发育阶段中特异性表达<sup>[9-11]</sup>。circRNA 具有选择性保守的微小 RNA (microRNA, miRNA) 靶位点,可以通过 miRNA 海绵调节下游基因的表达<sup>[12]</sup>。近年来研究表明, circRNA 具有保守性、稳定性、丰富性以及动态性的特点,使其成为新型临床诊断与治疗的重要靶点及标志物;同时, circRNA 广泛存在于胶质瘤、乳腺癌、肝癌等

多种肿瘤中,是肿瘤发生和发展的重要调节因子<sup>[13]</sup>。目前,已有部分 circRNA 被发现可作为皮肤黑色素瘤的潜在靶标,如 circ\_0062270<sup>[14]</sup> 等,但是 circRNA 在 UM 中的研究较匮乏。本课题组先前研究比较 circRNA 在 UM 组织和正常葡萄膜组织中的表达<sup>[15]</sup>,探讨了多个 circRNA 作为 UM 诊断与预后标志物的可能,发现与正常葡萄膜组织相比, hsa\_circ\_0103232 在 UM 组织中呈高表达,表明 hsa\_circ\_0103232 有望成为 UM 治疗新的潜在靶点。此外, Lin 等<sup>[16]</sup> 研究发现 hsa\_circ\_0103232 可能通过 miR-661 增强 RAB3D 的表达来促进皮肤黑色素瘤 (SKMe1、A375 和 A875) 的进展,进一步提示了 hsa\_circ\_0103232 在黑色素瘤中的作用。但尚未见 hsa\_circ\_0103232 对 UM 细胞作用的研究报道。本研究旨在探讨干扰 hsa\_circ\_0103232 对 UM 细胞 C918 和 MUM2B 增殖、迁移、周期和凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞及小干扰 RNA 来源** C918 和 MUM2B 细胞株购自中国科学院细胞培养库。3 个靶向 hsa\_circ\_

0103232 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) (si-hsa\_circ\_0103232#1、si-hsa\_circ\_0103232#2、si-hsa\_circ\_0103232#3) 及阴性对照 (siCtrl) 由湖州河马生物科技有限公司设计合成。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 胎牛血清 (04-002-1A, 以色列 BI 公司); RPMI-1640 培养基 (42401042)、胰蛋白酶 (25200-072) (美国 Gibco 公司); 1% 青霉素-链霉素-两性霉素 B (上海碧云天生物技术有限公司); Trizol (Cat#15596018, 美国 Ambion 公司); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (Cat#G891, 加拿大 Abm 公司); Primer Script RT 试剂盒 [RR014A, 宝日医生物技术 (北京) 有限公司]; TransStart Tip Green qPCR SuperMix (AQ141-01, 北京全式金公司生物技术有限公司); 结晶紫水溶液 (R20755, 上海源叶生物科技有限公司); 4% 多聚甲醛 (上海国药集团化学试剂有限公司); 细胞计数试剂盒 (cell counting kit, CCK)-8 (40203ES80)、细胞周期检测试剂盒 (40301ES60) [翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司]; 凋亡试剂盒 (88-8007, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Transwell 试剂盒 (3422, 美国 Corning 公司); Cyanine 3 标记的 hsa\_circ\_0103232 探针、荧光原位杂交试剂盒 (广州锐博生物科技有限公司)。Real-time PCR 仪 (7500Fast DX, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 流式细胞仪 (CytoFLEX FCM, 美国 Beckman 公司); 荧光显微镜 (IX71, 日本 Olympus 公司); 倒置显微镜 (U2-RFLT100, 美国 SPW industrial 公司); CO<sub>2</sub> 培养箱 (MCO-18AC, 日本 PHCbi 公司); 低速离心机 (L3-5K, 湖南可成仪器设备有限公司); 超净工作台 (KLCZ-880A, 北京亚泰科隆仪器技术有限公司); 酶标仪 (Infinite F50, 瑞士 Tecan 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 取 C918 和 MUM2B 细胞株, 置于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素-两性霉素 B 的 RPMI-1640 培养基中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。细胞培养 3 d 后传代, 待细胞处于对数生长期后进行后续研究。

**1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测各 siRNA 的干扰效果** 取对数生长期 C918 和 MUM2B 细胞, 接种至 6 孔板, 细胞接种密度为 2×10<sup>5</sup>/孔, 分为阴性对照 (siCtrl) 组、si-hsa\_circ\_0103232#1 组、si-hsa\_circ\_0103232#2 组和 si-hsa\_circ\_0103232#3 组。当细胞融合度达 70%~80% 时, 替换为不含胎牛血清和青霉素-链霉素-两性霉素 B 的培养基; 培养 4 h 后, 使用 RNAimax 转染试剂分别将 siCtrl、si-hsa\_circ\_0103232#1、si-hsa\_circ\_0103232#2 和 si-hsa\_circ\_0103232#3 转染到各组细胞

中, 继续培养 48 h。干扰序列如下: si-hsa\_circ\_0103232#1 为 5'-CUUGAUCUUGGUCACUCACAA-3'; si-hsa\_circ\_0103232#2 为 5'-AUCUUGAUCUUGGUCACUCAC-3'; si-hsa\_circ\_0103232#3 为 5'-UUCAUCUUGAUCUUGGUCACU-3'; siCtrl 为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'。弃去培养基, 使用 PBS 洗涤细胞 2 次。在 6 孔板中直接加入 1 ml Trizol 裂解细胞。提取细胞总 RNA 并逆转录为 cDNA; 按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增。引物序列如下: hsa\_circ\_0103232 正向引物序列为 5'-CTCAATTCGTTTGTCCCTGGC-3', 反向引物序列为 5'-GGACACCGTCTCTCTGGTCA-3'; β-actin 正向引物序列为 5'-CATGTACGTTGC TATCCAGGC-3', 反向引物序列为 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。反应体系: TransStart Tip Green qPCR Super Mix 10 μl, 正、反向引物各 1 μl, 模板 1 μl, 双蒸水补齐至 20 μl。以 β-actin 为内参, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 hsa\_circ\_0103232 相对表达量。

**1.2.3 细胞分组转染** 取处于对数生长期的 C918 和 MUM2B 细胞, 按 3×10<sup>5</sup>/孔分别接种至 6 孔板中, 分为 siCtrl 组和 si-hsa\_circ\_0103232 组。参照 1.2.2 部分方法分别将 siCtrl 和 si-hsa\_circ\_0103232 转染到各组细胞, 转染后 24 h 更换完全培养基进行后续实验。

**1.2.4 CCK-8 法检测细胞活力** 取对数生长期 C918 和 MUM2B 细胞, 调整细胞浓度至 1 000/μl, 按 100 μl/孔接种于 96 孔板中; 常规培养 24 h 后按照 1.2.3 方法分组转染相应 siRNA, 并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中分别培养 24、48、72 和 96 h。每孔加入 10 μl CCK-8 溶液后, 将培养板置于培养箱内孵育 4 h。使用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值。细胞活力 (%) = (A<sub>干扰组</sub> - A<sub>空白溶剂孔</sub>) / (A<sub>siCtrl组</sub> - A<sub>空白溶剂孔</sub>) × 100%。实验重复 3 次。

**1.2.5 细胞克隆形成实验检测细胞增殖能力** 分别收集转染后的 C918 和 MUM2B 细胞, 将 MUM2B 细胞按 1 600/孔或 C918 细胞按 2 400/孔分别接种于 6 孔板, 每 3 d 换液 1 次, 持续培养 15 d。磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 1 次, 每孔加入 1 ml 4% 多聚甲醛, 固定 30~60 min, PBS 洗涤 1 次。每孔加入结晶紫水溶液 (1:1 稀释) 500 μl, 染色 15 min。双蒸水洗涤数次, 晾干, 数码相机拍照, 并进行细胞克隆计数。实验重复 3 次。

**1.2.6 Transwell 实验检测细胞迁移能力** 分别收集转染后的 C918 和 MUM2B 细胞, 加入培养基重悬细胞

并调整 C918 细胞和 MUM2B 细胞浓度分别为  $2 \times 10^6$  和  $3 \times 10^7$  /ml。取 100  $\mu$ l 细胞悬液加入 Transwell 小室上层,置于细胞培养箱中,培养 24 h。弃去小室上、下层液体后重新向 24 孔板中加入 500  $\mu$ l PBS,小室中加 200  $\mu$ l PBS,静置清洗 5 min。弃去 PBS,向 24 孔板小孔内加入 500  $\mu$ l 甲醇固定 10 min,弃甲醇,向 24 孔板小孔内加入 500  $\mu$ l 结晶紫染色液染色 20 min。向小孔内重新加入 500  $\mu$ l PBS,使用棉签轻轻擦拭小室底膜上层细胞, PBS 清洗小室底膜, 10 min/次,清洗 3 次。将 Transwell 小室置于透明、干净载玻片上,光学显微镜下观察并拍照。实验重复 3 次。

**1.2.7 流式细胞术检测细胞周期** 分别收集转染的 C918 和 MUM2B 细胞,  $1\ 000 \times g$  离心 5 min, 弃上清, 使用 1 ml 预冷 PBS 清洗细胞 1 次, 离心收集细胞。细胞沉淀使用 1 ml 预冷 70% 乙醇轻轻混匀,  $4\ ^\circ\text{C}$  固定过夜。  $1\ 000 \times g$  离心 5 min 沉淀细胞。使用 1 ml 预冷 PBS 重悬细胞,  $1\ 000 \times g$  离心 5 min 沉淀细胞。在 0.25 ml 染色缓冲液中加入 5  $\mu$ l 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 溶液和 10  $\mu$ l RNaseA 溶液, 避光静置 15 min, 进行流式细胞仪上机检测。采用 CytExpert (Version 2.4, 美国 Beckman Coulter 公司) 分析软件进行细胞 DNA 含量和光散射分析, 并计算细胞周期的分布情况。实验重复 3 次。

**1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡** 分别收集转染后的 C918 和 MUM2B 细胞。使用 PBS 洗涤细胞 1 次后, 低速离心收集细胞, 使用 1 倍结合缓冲液重悬细胞。向 100  $\mu$ l 细胞悬液中加入 5  $\mu$ l 荧光染料偶联的 Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l PI 染液, 室温避光孵育 15 min。制备好的细胞悬液在 4 h 内进行流式细胞仪上机检测。采用流式分析软件 CytExpert 对实验结果进行分析, 计算细胞凋亡率。实验重复 3 次。

**1.2.9 荧光原位杂交实验确定 hsa\_circ\_0103232 在细胞中的定位** 分别将 C918 和 MUM2B 细胞接种于 6 孔板中, 置于  $37\ ^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h。采用 hsa\_circ\_0103232 探针标记细胞, 采用荧光原位杂交试剂盒检测 hsa\_circ\_0103232 表达信号, 使用 DAPI 进行细胞核染色。荧光显微镜下观察细胞中 hsa\_circ\_0103232 的表达情况和定位, hsa\_circ\_0103232 表现为红色荧光, 细胞核为蓝色荧光<sup>[16]</sup>, 以 18S 和 U6 作为内参对照, 18S 分布在细胞质中, U6 分布在细胞核中。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。各计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表

示。2 个组间细胞形成克隆数量、迁移细胞数、不同周期细胞百分比、细胞凋亡率差异比较采用独立样本 *t* 检验。各组间 hsa\_circ\_0103232 相对表达量比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。各组不同时间点细胞活力比较采用两因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。采用双侧检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组 siRNA 干扰效果比较

实时荧光定量 PCR 结果显示, 在 C918 细胞中, 各组 hsa\_circ\_0103232 相对表达量总体比较差异有统计学意义 ( $F = 19.10, P = 0.008$ ), 其中 si-hsa\_circ\_0103232#1 组 hsa\_circ\_0103232 的相对表达量为  $0.263 \pm 0.016$ , si-hsa\_circ\_0103232#2 组为  $0.237 \pm 0.108$ , 对照组表达量为  $1.013 \pm 0.008$ , 而 si-hsa\_circ\_0103232#3 靶点对 hsa\_circ\_0103232 表达无干扰效果。si-hsa\_circ\_0103232#1 与 siCtrl 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 1A)。在 MUM2B 细胞中, 各组 hsa\_circ\_0103232 相对表达量总体比较差异有统计学意义 ( $F = 49.17, P < 0.001$ ), 其中 si-hsa\_circ\_0103232#1 组相对表达量为  $0.469 \pm 0.028$ , 对照组相对表达量为  $1.004 \pm 0.108$ , 而 si-hsa\_circ\_0103232#2 和 si-hsa\_circ\_0103232#3 组相对表达量分别为  $0.620 \pm 0.074$  和  $0.533 \pm 0.012$ , 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 1B)。因此, 选择 si-hsa\_circ\_0103232#1 进行下一步研究。

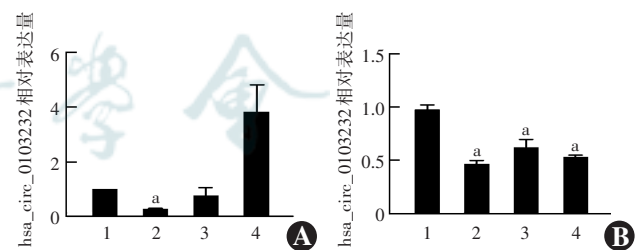


图 1 各组 hsa\_circ\_0103232 相对表达量比较 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n=3$ ) A: C918 细胞中各组 hsa\_circ\_0103232 表达量比较  $F=19.10, P=0.008$ 。与 siCtrl 组比较,  $^a P < 0.001$  B: MUM2B 细胞中各组 hsa\_circ\_0103232 表达量比较  $F=49.17, P < 0.001$ 。与 siCtrl 组比较,  $^a P < 0.001$  1: siCtrl 组; 2: si-hsa\_circ\_0103232#1 组; 3: si-hsa\_circ\_0103232#2 组; 4: si-hsa\_circ\_0103232#3 组

**Figure 1 Comparison of the relative expression of hsa\_circ\_0103232 among various groups (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n=3$ ) A: Comparison of the relative expression of hsa\_circ\_0103232 in C918 cells  $F=19.10, P=0.008$ . Compared with siCtrl group,  $^a P < 0.001$  B: Comparison of the relative expression of hsa\_circ\_0103232 in MUM2B cells  $F=49.17, P < 0.001$ . Compared with siCtrl group,  $^a P < 0.001$  1: siCtrl group; 2: si-hsa\_circ\_0103232#1 group; 3: si-hsa\_circ\_0103232#2 group; 4: si-hsa\_circ\_0103232#3 group**

### 2.2 各组不同时间点细胞活力和细胞克隆数比较

CCK-8 检测结果表明,与 siCtrl 组相比,si-hsa\_circ\_0103232 组 C918 和 MUM2B 细胞转染后各时间点的增殖活力均显著降低。相较于转染第 1 d,转染后 4 d,C918 细胞中 si-hsa\_circ\_0103232 组的细胞活力为  $(135.99 \pm 0.90)\%$ ,显著低于 siCtrl 组的  $(210.62 \pm 2.56)\%$ ,差异有统计学意义 ( $t = 38.86, P < 0.001$ ); MUM2B 细胞中 si-hsa\_circ\_0103232 组的细胞活力为  $(202.36 \pm 9.20)\%$ ,显著低于 siCtrl 组的  $(248.91 \pm 0.53)\%$ ,差异有统计学意义 ( $t = 7.141, P < 0.01$ ) (图 2)。细胞克隆形成实验结果显示,C918 细胞中 si-hsa\_circ\_0103232 组细胞克隆数为  $(12 \pm 1)$  个,显著低于 siCtrl 组的  $(28 \pm 4)$  个,差异有统计学意义 ( $t = 4.93, P = 0.008$ ); MUM2B 细胞中 si-hsa\_circ\_0103232 组细胞克隆数为  $(45 \pm 7)$  个,显著低于 siCtrl 组的  $(83 \pm 3)$  个,差异有统计学意义 ( $t = 7.42, P = 0.002$ ) (图 3)。

### 2.3 各组细胞迁移能力比较

Transwell 检测结果显示,C918 细胞中 si-hsa\_circ\_0103232 组迁移细胞数为  $(4 \pm 1)$  个,显著低于 siCtrl 组的  $(37 \pm 12)$  个,差异有统计学意义 ( $t = 3.91, P = 0.017$ );在 MUM2B 细胞中 si-hsa\_circ\_0103232 组迁移细胞数为  $(24 \pm 2)$  个,显著低于 siCtrl 组的  $(57 \pm 3)$  个,差异有统计学意义 ( $t = 10.80, P < 0.001$ ) (图 4)。

### 2.4 各组不同细胞周期比例比较

流式细胞术结果显示,C918 细胞中 si-hsa\_circ\_0103232 组 G0/G1 期细胞比例为  $(84.33 \pm 0.07)\%$ ,显著高于 siCtrl 组的  $(70.51 \pm 0.48)\%$ ,S 期和 G2/M 期细胞比例分别为  $(5.56 \pm 0.33)\%$  和  $(9.92 \pm 0.10)\%$ ,均显著低于 siCtrl 组的  $(11.28 \pm 0.24)\%$  和  $(17.98 \pm 0.56)\%$ ,差异均有统计学意义 ( $t = 40.50, 33.70, 20.00$ , 均  $P < 0.001$ ); MUM2B 细胞中 si-hsa\_circ\_0103232 组 G0/G1 期细胞比例为  $(51.27 \pm 0.68)\%$ ,显著高于 siCtrl 组的  $(47.48 \pm 0.75)\%$ ,G2/M 期细胞比例为  $(44.08 \pm 1.80)\%$ ,显著低于 siCtrl 组的  $(49.32 \pm 0.76)\%$ ,差异均有统计学意义

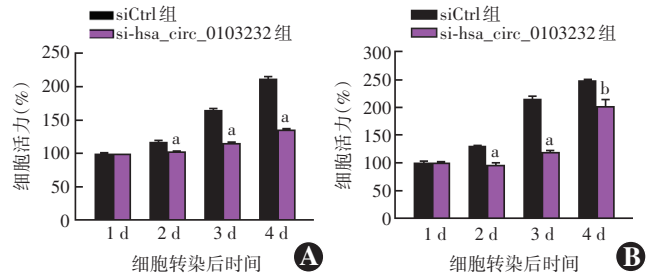


图 2 各组不同时间点细胞活力比较(独立样本 *t* 检验, Bonferroni 校正,  $n = 3$ ) A: 各组不同时间点 C918 细胞活力比较 与相应时间点 siCtrl 组比较,  $^a P < 0.001$  B: 各组不同时间点 MUM2B 细胞活力比较 与相应时间点 siCtrl 组比较,  $^a P < 0.001, ^b P < 0.01$  siCtrl: 阴性对照 siRNA; si-hsa\_circ\_0103232: 靶向 hsa\_circ\_0103232 的 siRNA

Figure 2 Comparison of cell viability at different time points between two groups (Independent samples *t*-test, Bonferroni correction,  $n = 3$ ) A: Comparison of C918 cell viability Compared with siCtrl group at corresponding time points,  $^a P < 0.001$  B: Comparison of MUM2B cell viability Compared with siCtrl group at corresponding time points,  $^a P < 0.001, ^b P < 0.01$  siCtrl: negative control siRNA; si-hsa\_circ\_0103232: siRNA targeting hsa\_circ\_0103232

( $t = 5.286, 3.79$ , 均  $P < 0.05$ ) (图 5)。

### 2.5 各组细胞凋亡率比较

流式细胞术结果显示, si-hsa\_circ\_0103232 组 C918 和 MUM2B 细胞凋亡率分别为  $(15.46 \pm 0.23)\%$  和  $(14.90 \pm 0.66)\%$ ,均显著多于 siCtrl 组的  $(9.31 \pm$

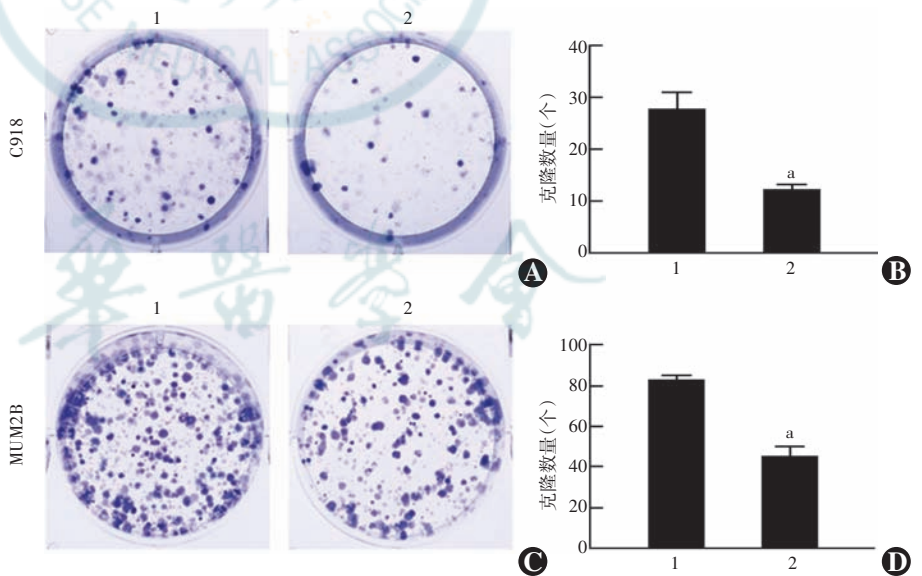


图 3 各组细胞克隆数量比较 A: 各组 C918 细胞克隆形成情况(结晶紫  $\times 200$ ) B: 各组 C918 细胞形成克隆数比较 与 siCtrl 组比较,  $^a P < 0.05$  (独立样本 *t* 检验,  $n = 3$ ) C: 各组 MUM2B 细胞克隆形成情况(结晶紫  $\times 200$ ) D: 各组 MUM2B 细胞克隆数比较 与 siCtrl 组比较,  $^a P < 0.05$  (独立样本 *t* 检验,  $n = 3$ ) 1: siCtrl 组; 2: si-hsa\_circ\_0103232 组

Figure 3 Comparison of the number of cell clones formed between two groups A: Clone formation of C918 cells (crystal violet  $\times 200$ ) B: Comparison of the number clones formed by C918 cells between two groups Compared with siCtrl group,  $^a P < 0.05$  (Independent samples *t*-test,  $n = 3$ ) C: Clone formation of MUM2B cells (crystal violet  $\times 200$ ) D: Comparison of the number of clones formed by MUM2B cells between two groups Compared with siCtrl group,  $^a P < 0.05$  (Independent samples *t*-test,  $n = 3$ ) 1: siCtrl group, 2: si-hsa\_circ\_0103232 group

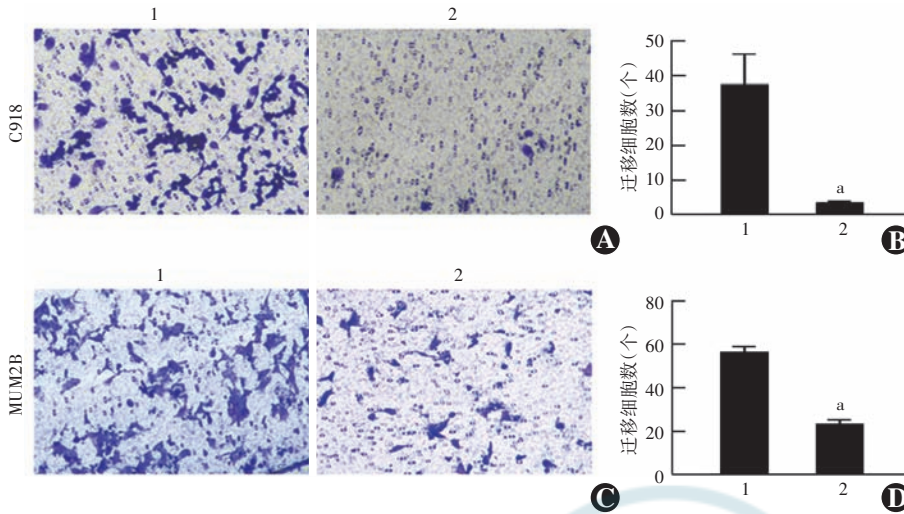


图 4 各组 C918 和 MUM2B 细胞迁移数比较 A: 各组 C918 细胞迁移情况 (结晶紫×200) B: 各组 C918 细胞迁移数比较 与 siCtrl 组比较,  $^aP < 0.05$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) C: 各组 MUM2B 细胞迁移情况 (结晶紫×200) D: 各组 MUM2B 细胞迁移数比较 与 siCtrl 组比较,  $^aP < 0.05$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) 1: siCtrl 组; 2: si-hsa\_circ\_0103232 组

Figure 4 Comparison of the number of migrating C918 and MUM2B cells between two groups A: Migration of C918 cells (crystal violet ×200) B: Comparison of the number of migrating C918 cells between two groups Compared with siCtrl group,  $^aP < 0.05$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) C: Migration of MUM2B cells (crystal violet ×200) D: Comparison of the number of migrating MUM2B cells between two groups Compared with siCtrl group,  $^aP < 0.05$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) 1: siCtrl group; 2: si-hsa\_circ\_0103232 group

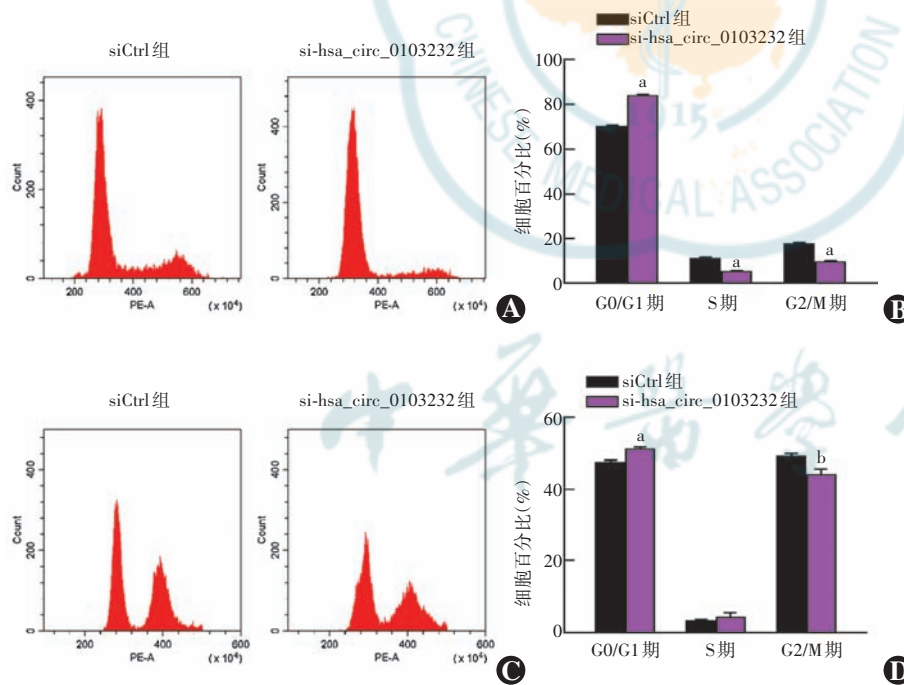


图 5 各组不同细胞周期分布比较 A: 各组 C918 细胞周期分布流式细胞图 B: 各组 C918 细胞周期分布量化比较 与相应细胞周期 siCtrl 组比较,  $^aP < 0.001$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) C: 各组 MUM2B 细胞周期分布流式细胞图 D: 各组 MUM2B 细胞周期分布量化比较 与相应细胞周期 siCtrl 组比较,  $^aP < 0.05$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) siCtrl: 阴性对照 siRNA; si-hsa\_circ\_0103232: 靶向 hsa\_circ\_0103232 的 siRNA

Figure 5 Comparison of cell cycle distribution between two groups A: Flow cytometry of C918 cell cycle distribution B: Quantitative comparison of cell cycle distribution of C918 cells between two groups Compared with siCtrl group at the corresponding cell cycles,  $^aP < 0.001$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) C: Flow cytometry of MUM2B cell cycle distribution D: Quantitative comparison of cell cycle distribution of C918 cells between two groups Compared with siCtrl group at the corresponding cell cycles,  $^aP < 0.05$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) siCtrl: negative control siRNA; si-hsa\_circ\_0103232: siRNA targeting hsa\_circ\_0103232

0.05)% 和 (5.79±0.14)%, 差异均有统计学意义 ( $t = 36.83$ 、19.02, 均  $P < 0.001$ ) (图 6)。

### 2.6 hsa\_circ\_0103232 在 C918 和 MUM2B 细胞中的定位

荧光原位杂交实验结果显示, hsa\_circ\_0103232 与细胞核染色存在共定位, hsa\_circ\_0103232 主要在细胞核中表达 (图 7)。

### 3 讨论

UM 患者常见的临床表现为无痛性视力下降、视野缺损、光幻觉或虹膜颜色改变等; 约 30% 的 UM 患者无症状, 仅能通过常规眼底检查发现<sup>[17]</sup>。目前, UM 有多种治疗方式, 包括经质子束放射治疗、巩膜敷贴放射治疗、经瞳孔温热疗法、激光光凝和肿瘤局部切除以及眼球摘除等<sup>[18]</sup>。UM 早期可发生肿瘤转移, 转移至肝脏、肺部和骨骼, 分别约占 89%、29% 和 17%<sup>[19-21]</sup>。目前, UM 患者在诊断后 5、15、25 和 35 年的病死率分别为 31%、45%、49% 和 52%<sup>[5, 22]</sup>。现阶段, UM 诊断和预后的有效分子标志物及治疗靶点仍十分欠缺, 亟待使用新的研究思路和手段来发掘 UM 转移过程中的关键调控因子, 为 UM 的临床诊疗提供新的线索。

circRNA 早期被认为是转录错误或副产物<sup>[23]</sup>; 近年来, circRNA 因其在恶性肿瘤发生和发展中的重要调控作用已成为肿瘤领域的研究热点<sup>[22]</sup>。CiRS-7 是一种经典的促癌 circRNA, 在多种肿瘤中呈异常高表达, 包括肝癌、肺癌、结直肠癌、乳腺癌和食管癌等; 研究表明其可竞争结合抑癌基因 miR-7, 拮抗 miR-7 对 PI3K/AKT、ERGF 等促肿瘤增生信号通路的抑制作用, 进而增强肿瘤细胞的增殖能力<sup>[24]</sup>。

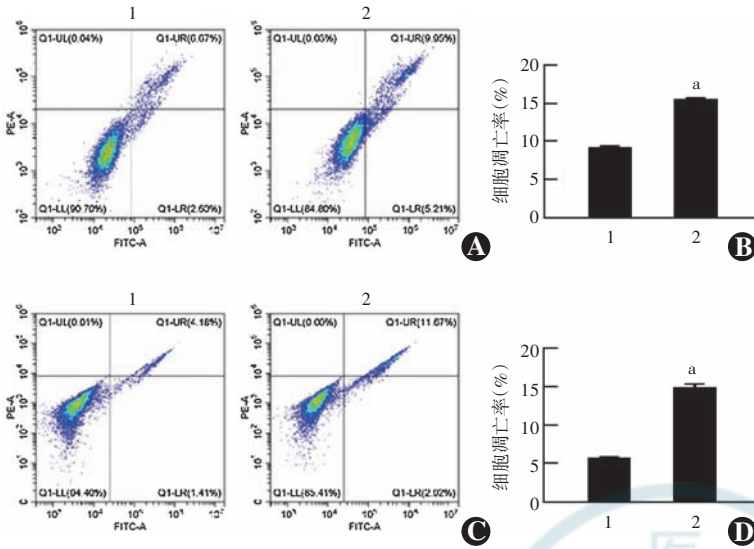


图 6 各组细胞凋亡数比较 A: 各组 C918 细胞凋亡流式细胞图 B: 各组 C918 细胞凋亡率比较 与 siCtrl 组比较,  $^aP < 0.001$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) C: 各组 MUM2B 细胞凋亡流式细胞图 D: 各组 MUM2B 细胞凋亡数比较 与 siCtrl 组比较,  $^aP < 0.001$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) 1: siCtrl 组; 2: si-hsa\_circ\_0103232 组

Figure 6 Comparison of cell apoptosis among various groups A: Flow cytometry of C918 cell apoptosis B: Comparison of the number of apoptotic C918 cells Compared with siCtrl group,  $^aP < 0.001$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) C: Flow cytometry of MUM2B cell apoptosis D: Comparison of the number of apoptotic MUM2B cells Compared with siCtrl group,  $^aP < 0.001$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) 1: siCtrl group; 2: si-hsa\_circ\_0103232 group

因子  $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 的表达增加, 诱导 TGF $\beta 1$ /p-Smad2/3 信号通路的激活, 以增强前列腺癌细胞侵袭浸润与转移<sup>[25]</sup>。综上, circRNA 的异常表达可调控肿瘤细胞的增殖、迁徙等生物学行为, 在肿瘤的发生和发展中起重要作用。

本课题组前期通过微阵列揭示 hsa\_circ\_0103232 在 UM 组织中呈高表达, 表明其可能参与 UM 的进展<sup>[15]</sup>。本研究中采用 siRNA 干扰 C918 和 MUM2B 细胞中 hsa\_circ\_0103232 的表达并观察细胞增殖、转移能力变化, 发现干扰 hsa\_circ\_0103232 能显著降低 C918 和 MUM2B 细胞活力, 减少克隆形成, 有效抑制细胞增殖和转移。本研究还发现, 干扰 hsa\_circ\_0103232 后, 细胞周期受抑制, 且凋亡数量显著增加。以上结果均表明, 敲低 hsa\_circ\_0103232 能抑制细胞增殖转移、促进凋亡, 提示 hsa\_circ\_0103232 可能具有癌基因的角色, 或可作为 UM 的治疗靶点。本研究荧光原位杂交实验结果显示 hsa\_circ\_0103232 在细胞核中表达, 与 Lin 等<sup>[16]</sup> hsa\_circ\_0103232 在细胞质中的报道不一致, 这可能是由于不同种类细胞的差异造成。

综上所述, 本研究结果显示 hsa\_circ\_0103232 定位在 UM 细胞的细胞核中; 干扰 hsa\_circ\_0103232 能显著抑制 UM 细胞的增殖、迁移和细胞周期进程, 促进细胞凋亡。本研究的局限性在于缺乏动物实验以对 hsa\_circ\_0103232 进行深入的发展和转移分子机制的探究, 这也将是本课题组下一步研究重点。本研究探讨了 circRNA 在 UM 中的作用, hsa\_circ\_0103232 可能成为抑制 UM 进展的潜在治疗靶点, 为 UM 的疾病控制与治疗提供了新方向。

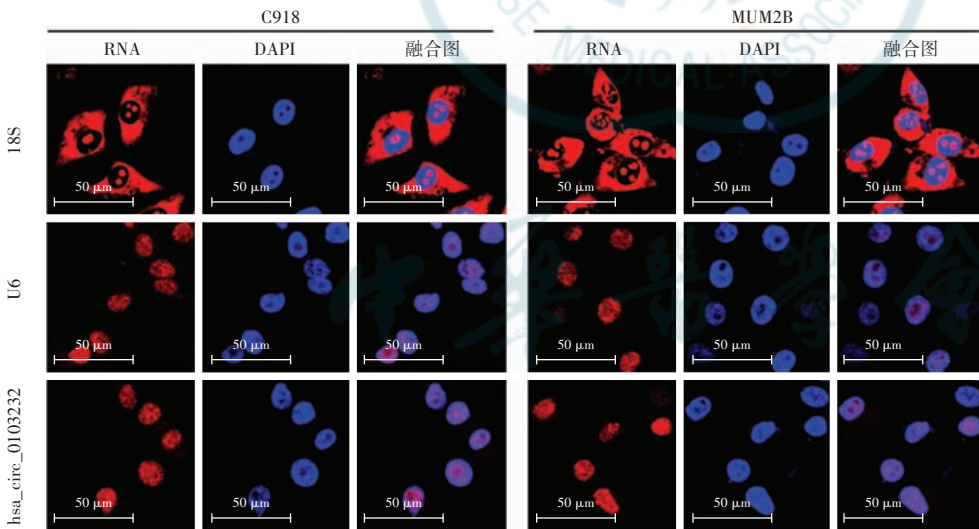


图 7 hsa\_circ\_0103232 在 C918 和 MUM2B 细胞中荧光原位杂交定位情况 (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) 内参探针 18S、U6、hsa\_circ\_0103232 RNA 染色均为红色荧光 (Alexa Fluor 594), 细胞核染色均为蓝色荧光 (DAPI)  
Figure 7 Localization of hsa\_circ\_0103232 in C918 and MUM2B cells by fluorescence in situ hybridization (scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ) The internal control probes 18S, U6 and hsa\_circ\_0103232 RNA were stained with red fluorescence (Alexa Fluor 647), and the nuclei were stained with blue fluorescence (DAPI)

circRNA 对肿瘤细胞的侵袭转移能力具有重要调控作用, 可激活多个信号通路以促进肿瘤的转移。有研究发现, circRNA-51217 在前列腺癌组织及细胞株中高表达, 并与 miRNA-646 竞争性结合, 可能导致转化生长

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 杨萱: 直接参与选题、酝酿和设计实验、起草文章、实施研究、采集数据、分析/解释数据、对文章知识性内容的审阅; 魏文斌: 直接参与选题、酝酿和设计实验、对文章智力性内容的修改及定稿

## 参考文献

- [1] Toro MD, Gozzo L, Tracia L, et al. New therapeutic perspectives in the treatment of uveal melanoma: a systematic review [J/OL]. *Biomedicines*, 2021, 9(10): 1311 [2023-11-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34680428>. DOI: 10.3390/biomedicines9101311.
- [2] Li Y, Shi J, Yang J, et al. Uveal melanoma: progress in molecular biology and therapeutics [J/OL]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12: 1758835920965852 [2023-11-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33149769>. DOI: 10.1177/1758835920965852.
- [3] Fallico M, Raciti G, Longo A, et al. Current molecular and clinical insights into uveal melanoma (review) [J/OL]. *Int J Oncol*, 2021, 58(4): 10 [2023-11-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33649778>. DOI: 10.3892/ijo.2021.5190.
- [4] Rossi E, Croce M, Reggiani F, et al. Uveal melanoma metastasis [J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(22): 5684 [2023-11-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34830841>. DOI: 10.3390/cancers13225684.
- [5] Khoja L, Atenafu EG, Suci S, et al. Meta-analysis in metastatic uveal melanoma to determine progression free and overall survival benchmarks: an international rare cancers initiative (IRCI) ocular melanoma study [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(8): 1370-1380. DOI: 10.1093/annonc/mdz176.
- [6] Rantala ES, Hernberg M, Kivelä TT. Overall survival after treatment for metastatic uveal melanoma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Melanoma Res*, 2019, 29(6): 561-568. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000575.
- [7] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs [J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 141-148. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.003.
- [8] 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. DOI: 10.1261/rna.035667.112.
- [9] Starke S, Jost I, Rossbach O, et al. Exon circularization requires canonical splice signals [J]. *Cell Rep*, 2015, 10(1): 103-111. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.12.002.
- [10] Chen LL, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis [J]. *RNA Biol*, 2015, 12(4): 381-388. DOI: 10.1080/15476286.2015.1020271.
- [11] Chen X, Fan S, Song E. Noncoding RNAs: new players in cancers [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 927: 1-47. DOI: 10.1007/978-981-10-1498-7\_1.
- [12] Li Z, Deng X, Lan Y. Identification of a potentially functional circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in type 2 diabetes mellitus by integrated microarray analysis [J/OL]. *Minerva Endocrinol (Torino)*, 2021 [2023-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33792237>. DOI: 10.23736/S2724-6507.21.03370-8. [Online ahead of print].
- [13] Chen S, Zhao Y. Circular RNAs: characteristics, function, and role in human cancer [J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33(9): 887-893. DOI: 10.14670/HH-11-969.
- [14] Chen X, Tang Y, Yan J, et al. Circ\_0062270 upregulates EPHA2 to facilitate melanoma progression via sponging miR-331-3p [J]. *J Dermatol Sci*, 2021, 103(3): 176-182. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2021.08.005.
- [15] Yang X, Li Y, Liu Y, et al. Novel circular RNA expression profile of uveal melanoma revealed by microarray [J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(6): 656-668. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2018.06.10.
- [16] Lin X, Zhong L, Wang N, et al. Hsa\_circ\_0103232 promotes melanoma cells proliferation and invasion via targeting miR-661/RAB3D [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(17): 1811-1826. DOI: 10.1080/15384101.2022.2072636.
- [17] Damato EM, Damato BE. Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: an evaluation of 2,384 patients [J]. *Ophthalmology*, 2012, 119(8): 1582-1589. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.01.048.
- [18] Shields CL, Shields JA, Cater J, et al. Plaque radiotherapy for uveal melanoma: long-term visual outcome in 1106 consecutive patients [J]. *Arch Ophthalmol*, 2000, 118(9): 1219-1228. DOI: 10.1001/archophth.118.9.1219.
- [19] Shields JA, Shields CL. Management of posterior uveal melanoma: past, present, and future: the 2014 Charles L. Schepens lecture [J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(2): 414-428. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.08.046.
- [20] Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15 [J]. *Arch Ophthalmol*, 2001, 119(5): 670-676. DOI: 10.1001/archophth.119.5.670.
- [21] Kujala E, Mäkitie T, Kivelä T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma [J]. 2003, 44(11): 4651-4659.
- [22] Kristensen LS, Hansen TB, Venø MT, et al. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field [J]. *Oncogene*, 2018, 37(5): 555-565. DOI: 10.1038/onc.2017.361.
- [23] Cocquerelle C, Mascrez B, Hétauin D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules [J]. *FASEB J*, 1993, 7(1): 155-160. DOI: 10.1096/fasebj.7.1.7678559.
- [24] Chen J, Yang J, Fei X, et al. CircRNA ciRS-7: a novel oncogene in multiple cancers [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(1): 379-389. DOI: 10.7150/ijbs.54292.
- [25] Xu H, Sun Y, You B, et al. Androgen receptor reverses the oncometabolite R-2-hydroxyglutarate-induced prostate cancer cell invasion via suppressing the circRNA-51217/miRNA-646/TGFβ1/p-Smad2/3 signaling [J]. *Cancer Lett*, 2020, 472: 151-164. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.12.014.

(收稿日期: 2023-12-22 修回日期: 2024-02-20)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

读者 · 作者 · 编者

## 本刊对论文题目的要求

论文题目力求简洁、特异、明确,能准确反映文章主题和特定内容,具有可检索性。中文文题一般以 25 个汉字以内为宜,一般不设副标题,尽量不用标点符号,文题中避免使用不为同行熟知的符号、简称、缩略语和商品名。论著文章和综述须有与中文文题含意一致的英文文题。

(本刊编辑部)