

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.007

## 环状 RNA Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤中的表达 及其对 A375 细胞恶性表型的影响 \*

杨莹莹<sup>1</sup> 张 坤<sup>2</sup> 毛康琳<sup>1</sup> 孙 靓<sup>1</sup> 穆 欣<sup>1Δ</sup>

(1 西安交通大学第一附属医院皮肤科; 2 西安交通大学第一附属医院感染科 陕西 西安 710061)

**摘要 目的:**通过检测环状 RNA Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤细胞与正常表皮黑色素细胞中的表达差异,及其对恶性黑色素瘤 A375 细胞恶性表型的影响,阐明 Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤细胞中的表达及功能。**方法:**采用聚合酶链式反应 (Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-QPCR) 方法检测正常表皮黑色素细胞和恶性黑色素瘤细胞中 Circ\_0001073 的表达水平;应用小干扰 RNAs 沉默恶性黑色素瘤 A375 细胞中 Circ\_0001073 表达,5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 实验检测沉默 Circ\_0001073 对 A375 细胞增殖的影响,平板克隆实验检测沉默 Circ\_0001073 对 A375 细胞克隆形成的影响,细胞划痕实验评估沉默 Circ\_0001073 对 A375 细胞迁移能力的影响,Transwell 实验评估沉默 Circ\_0001073 对 A375 细胞侵袭能力的影响。**结果:**qRT-PCR 结果显示 Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤细胞中的表达低于正常表皮黑色素 HEMa-LP 细胞 ( $P<0.05$ )。应用 Circ\_0001073 siRNA 转染 A375 细胞后, Circ\_0001073 的表达水平较转染 Circ\_0001073 NC 的细胞显著降低 ( $P<0.05$ )。EdU 实验结果显示:沉默 A375 细胞中 Circ\_0001073 的表达后, A375 细胞增殖能力显著增强 ( $P<0.05$ ); 平板克隆实验结果显示:沉默 A375 细胞中 Circ\_0001073 的表达后, A375 细胞克隆形成能力显著增强 ( $P<0.05$ ); 细胞划痕实验结果显示:沉默 A375 细胞中 Circ\_0001073 的表达后, 细胞迁移能力显著增强 ( $P<0.05$ ); Transwell 实验结果显示:沉默 A375 细胞中 Circ\_0001073 的表达后, 细胞侵袭能力显著增强 ( $P<0.05$ )。**结论:**Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤细胞中低表达,并可抑制 A375 细胞的增殖、克隆形成、迁移及侵袭。

**关键词:**恶性黑色素瘤; Circ\_0001073; 增殖; 迁移; 侵袭

**中图分类号:**R-33; R739.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)07-1236-05

## Expression of Circular RNA Circ\_0001073 in Malignant Melanoma and Its Effects on Malignant Phenotypes of A375 Cells\*

YANG Ying-ying<sup>1</sup>, ZHANG Kun<sup>2</sup>, MAO Kang-lin<sup>1</sup>, SUN Liang<sup>1</sup>, MU Xin<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Dermatology; 2 Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

**ABSTRACT Objective:** To demonstrate the expression and function of Circ\_0001073 in A375 cells by investigating the expression of circular RNA Circ\_0001073 in malignant melanoma cells and normal epidermal melanoma cells, and exploring the effects of Circ\_0001073 on malignant phenotypes of A375 cells. **Methods:** Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-QPCR) was performed to detect the expression of Circ\_0001073 in normal epidermal melanoma cells and malignant melanoma cells. Silencing the expression of Circ\_0001073 in A375 cells by small interfering RNAs (siRNAs). 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assays were performed to detect the effects of Circ\_0001073 knockdown on cell proliferation of A375 cells; Colony forming assays were performed to detect the effects of Circ\_0001073 knockdown on colony forming ability of A375 cells; Wound healing assays were performed to detect the effects of Circ\_0001073 knockdown on migrative ability of A375 cells; Transwell assays were performed to detect the effects of Circ\_0001073 knockdown on invasive ability of A375 cells. **Results:** Compared to normal epidermal melanocytes HEMa-LP cells, Circ\_0001073 was downregulated in malignant melanoma cells ( $P<0.05$ ). After silencing the expression of Circ\_0001073 by siRNAs in A375 cells, the expression of Circ\_0001073 was significantly down-regulated in A375 cells transfected with Circ\_0001073 siRNA compared to A375 cells transfected with Circ\_0001073 NC ( $P<0.05$ ). EdU assays indicated the cell proliferation was enhanced after silencing the expression of Circ\_0001073 in A375 cells ( $P<0.05$ ); Colony forming assays indicated the colony forming ability was enhanced after silencing the expression of Circ\_0001073 in A375 cells ( $P<0.05$ ); Wound healing assays indicated the cell migrative ability was enhanced after silencing the expression of Circ\_0001073 in A375 cells ( $P<0.05$ ); Transwell assays indicated the cell invasive ability was enhanced after silencing the expression of Circ\_0001073 in A375 cells ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Circ\_0001073 is down-regulated in malignant melanoma

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81802935);陕西省自然科学基金项目(2019JM-487)

作者简介:杨莹莹(1992-),女,硕士,医师,主要从事恶性黑色素瘤转移机制的研究, E-mail: yanggy92@163.com

Δ 通讯作者:穆欣(1974-),女,副主任医师,副教授,硕士生导师,主要从事恶性黑色素瘤及银屑病发病及进展机制的研究,

E-mail: muxin0510@163.com, 电话: 029-85324614

(收稿日期:2019-09-30 接受日期:2019-10-25)

cells, and Circ\_0001073 could inhibits cell proliferation, colony forming, migrative and invasive ability of A375 cells.

**Key words:** Malignant melanoma; Circ\_0001073; Proliferation; Migration; Invasion

**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R739.5 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2020)07-1236-05

## 前言

过去十年,恶性黑素瘤的发病率与日俱增,严重威胁着人类的健康<sup>[1]</sup>。尽管,近年来恶性黑素瘤的治疗手段不断更新,但患者五年生存率仍较低<sup>[2,3]</sup>。寻找新的治疗靶点仍是恶性黑素瘤基础研究领域亟待解决的科学问题。环状 RNA(Circular RNA, CircRNA)是一类广泛表达的内源性调控性 RNAs,其 3' 端和 5' 端可形成共价键连接的闭合环状结构<sup>[4]</sup>。最新研究表明,环状 RNA 可作为竞争性内源性 RNA(Competing endogenous RNA, ceRNA)吸附微小 RNA(microRNA, miRNA)而参与调控细胞增殖、分化、侵袭、凋亡等生物学进程<sup>[5]</sup>。Circ\_0001073 是新近发现的抑癌性环状 RNA,其可通过吸附 miR-626 而抑制膀胱癌细胞增殖和侵袭<sup>[6]</sup>。然而,截至目前 Circ\_0001073 在恶性黑素瘤细胞中的表达及功能,尚无研究关注。本实验拟通过 RT-QPCR 和 EdU 方法阐明 Circ\_001073 在恶性黑素瘤细胞中的表达及功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

RNA 提取及反转录试剂盒购买自康为世纪科技有限公司,RT-QPCR 购买于广州锐博科技有限公司,DMEM 培养基购买于美国 Gibco 公司,胎牛血清购自北京赛澳美细胞技术有限公司,Circ\_0001073 NC 及 siRNA 由上海吉玛科技有限公司合成,EdU 细胞增殖检测试剂盒购买于广州锐博科技有限公司,CCK-8 试剂盒购买于北京碧云天科技有限公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,基质胶购自美国 BD 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 恶性黑素瘤 A375 细胞及正常黑素 HEMa-LP 细胞购买自上海吉凯基因化学技术有限公司,细胞所用培养基为含有胎牛血清浓度 10%的 DMEM 培养液,细胞孵箱条件设定为:温度:37℃,CO<sub>2</sub> 浓度:5%。

**1.2.2 RNA 提取及反转录** RNA 提取及反转录实验具体步骤参照试剂盒附带说明书,简述如下:细胞经胰酶消化后,制成单细胞悬液,离心后弃去上清,加入 600 μL Buffer RL,反复吹打直至完全裂解,5000×g 离心 2 min。加入 600 μL 70%乙醇,混匀后加入收集管吸附柱中,5000×g 离心 1 min。吸附柱中加入 800 μL DNase I 混合液,室温孵育 20 min。加入 500 μL Buffer RW1 液,5000×g 离心 1 min,加入 500 μL Buffer RW2,5000×g 离心 1 min。弃去废液后,5000×g 离心 2min,室温晾干。将吸附柱置于新离心管中,加入 50 μL RNase-Free Water,室温放置 1min,5000×g 离心 1 min,所得 RNA 储存于 -70℃ 冰箱。RNA 定量后,配置反应液:1 μg RNA,1 μL dNTP 混合液,1 μL 随机六聚体,4 μL 5× RT 缓冲液,1 μL Maxima RT,1 μL Ribolock,去离子水补齐至 20 μL。25℃反应 10 min,50℃反应 30 min,85℃反应 5 min,加入 480 μL RNase-Free Water。冰上冷

却,备用。

**1.2.3 RT-QPCR** RT-QPCR 实验具体步骤参照试剂盒附带说明书,简述如下:配置 QPCR 反应液:10× buffer 2 μL, Circ\_0001073 或 GAPDH 正义链引物 1 μL, Circ\_0001073 或 GAPDH 反义链引物 1 μL,反转录模板 2 μL,去离子水 14 μL。程序设定:预变性 95℃反应 5 min;变性 95℃反应 15 s,退火 60℃反应 60 s,延伸 72℃反应 30 s,40 个循环;4℃储存。Circ\_0001073 正向引物序列:5'-AAGATGGCCTACCCTCCTGT-3', Circ\_0001073 反向引物序列:5'-CCATAACACGGTTCAACACC-3';GAPDH 正向引物序列:5'-CAAGGCTGA-GAACGGGAAG-3';GAPDH 反向引物序列:5'-TGAA-GACGCCAGTGGACTC-3'。

**1.2.4 siRNA 转染** A375 细胞铺六孔板,过夜培养至汇合度 50%左右,配置转染试剂 A:5 μL Circ\_0001073 NC/siRNA(50 nM)+250 μL optiMEM;转染试剂 B:5 μL Lipofectamine2000+250 μL optiMEM。混合转染试剂 A 和 B,室温条件下放置 15 min,逐滴加入六孔板细胞中,24 h 后更换为完全培养基,72 h 后收集细胞,转染 Circ\_0001073 NC 组细胞命名为对照组,转染 Circ\_0001073 siRNA 组细胞命名为试验组,备后续实验使用。

**1.2.5 EdU 细胞增殖** EdU 检测细胞增殖实验步骤参照试剂盒所附说明书,简述如下:接种 10000 实验组与对照组细胞至 96 孔板,每孔加入 100 μL EdU 培养基(50 μM)培养 2 h。PBS 清洗 3 次后,4%多聚甲醛固定 30 min。50 μL 甘氨酸(2mg/mL)摇床孵育 5 min。PBS 清洗 3 次后,0.5%Trinton X-100 摇床孵育 10 min。PBS 清洗 3 次,加入 100 μL 1xApollo 染色反应液,摇床避光孵育 30 min。加入 5 μL DAPI 染色液,摇床避光孵育 5 min,PBS 清洗 3 次后,荧光显微镜拍照,随机拍摄十个视野,统计两组细胞各视野下红色荧光细胞数目差异。

**1.2.6 平板克隆** 细胞消化计数后,300 个实验组或对照组细胞铺于 6 孔板,放置于细胞孵箱中培养 10 天,90%甲醇固定 5min,PBS 清洗 3 次后,0.1%结晶紫染色 10 min,PBS 清洗 3 次后,拍照比较实验组与对照组细胞克隆形成数目差异。

**1.2.7 细胞划痕** 实验组与对照组细胞铺板后,培养至 100%汇合度,使用高温灭菌的 10 μL 枪头均匀划线,PBS 清洗两次后,加入无血清的 DMEM 培养基,即刻拍照作为 0 h 细胞间距。继续培养 24 h 后,再次拍照,作为 24 h 细胞间距。比较两组细胞(0h 细胞间距-24 h 细胞间距)/0 h 细胞间距比值差异。

**1.2.8 Transwell** 取 80000 个实验组与对照组细胞,200 μL 无血清培养基重悬,滴加至已预先铺基质胶的 Transwell 孔中,将 Transwell 小孔置于 20%胎牛血清浓度的 DMEM 培养基的 24 孔板中。48 h 后,100%甲醇固定 5 min,PBS 清洗 3 次后,0.1%结晶紫染色 10 min,PBS 清洗三次后,室温条件下晾干后拍照,随机选取十个视野,统计各视野下穿过 Transwell 膜的细胞数,比较两组细胞侵袭数目差异。

### 1.3 统计学分析

所有数据均分析均采用 SPSS 22.0 软件包。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 三组间差异分析采用方差分析及 LSD-t 检验, 两组间差异分析采用独立样本双侧 t 检验。P<0.05 视为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤细胞中低表达

RT-QPCR 结果显示, 正常黑素细胞 HEMa-LP 中 Circ\_0001073 的相对表达水平为  $1.00 \pm 0.053$ , 黑色素瘤 A2058 细胞中 Circ\_0001073 相对表达水平为  $0.371 \pm 0.031$ , 黑色素瘤

A375 细胞中 Circ\_0001073 相对表达水平为  $0.513 \pm 0.064$ , 三组间 Circ\_0001073 表达差异有统计学意义 (图 1A,  $F=10.742$ ,  $P=0.027$ ), 提示 Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤中很可能发挥抑癌基因的作用。我们进一步利用 siRNA 沉默 A375 细胞中 Circ\_0001073 表达, 为后续功能学实验奠定基础。结果显示: 转染 Circ\_0001073 NC 组细胞中 Circ\_0001073 相对表达水平为  $1.000 \pm 0.043$ , 转染 Circ\_0001073 siRNA 组细胞中 Circ\_0001073 相对表达水平为  $0.373 \pm 0.062$ , 两组间 Circ\_0001073 表达差异有统计学意义 (图 1B,  $t=4.512$ ,  $P=0.015$ ), 提示 Circ\_0001073 siRNA 可有效沉默 A375 细胞中 Circ\_0001073 表达。

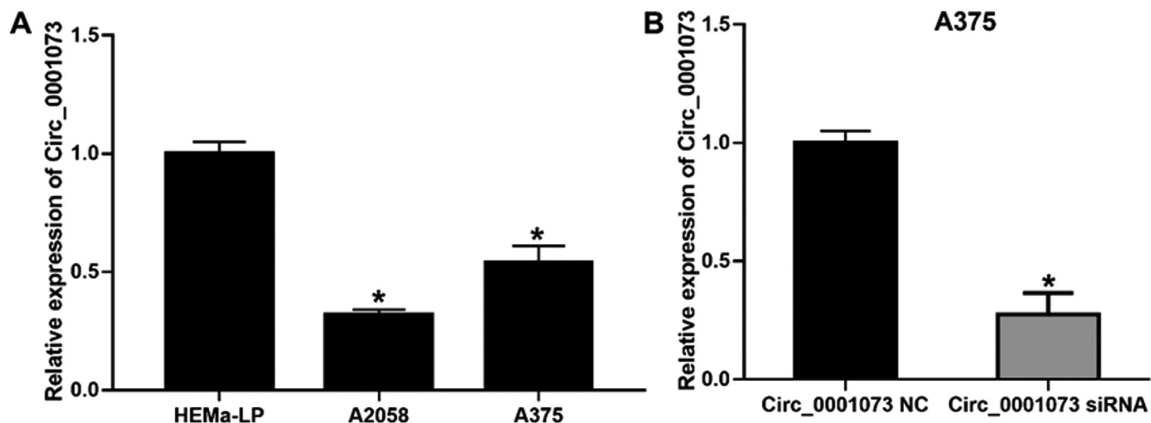


图 1 Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤细胞中的表达

A: Circ\_0001073 在正常黑素细胞和恶性黑色素瘤细胞中的表达; B: Circ\_0001073 siRNA 的沉默效率。

Fig.1 Circ\_0001073 expression in malignant melanoma cells

A: Circ\_0001073 expression in human epidermal melanoma cells and malignant melanoma cells; B: Efficacy of Circ\_0001073 siRNA.

Note: Data are expressed as  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ . Compared with HEMa-LP/ Circ\_0001073 NC group, \* $P<0.05$ .

### 2.2 Circ\_0001073 抑制 A375 细胞增殖

EdU 实验结果显示: 转染 Circ\_0001073 NC 组细胞中 EdU 阳性细胞百分比为  $(11.434 \pm 5.627)\%$ , 转染 Circ\_0001073 siRNA

NA 组细胞中 EdU 阳性细胞百分比为  $(32.834 \pm 8.329)\%$ , 两组差异有统计学意义 (图 2,  $t=4.136$ ,  $P=0.021$ ), 沉默 Circ\_0001073 后, 细胞增殖能力显著增强。

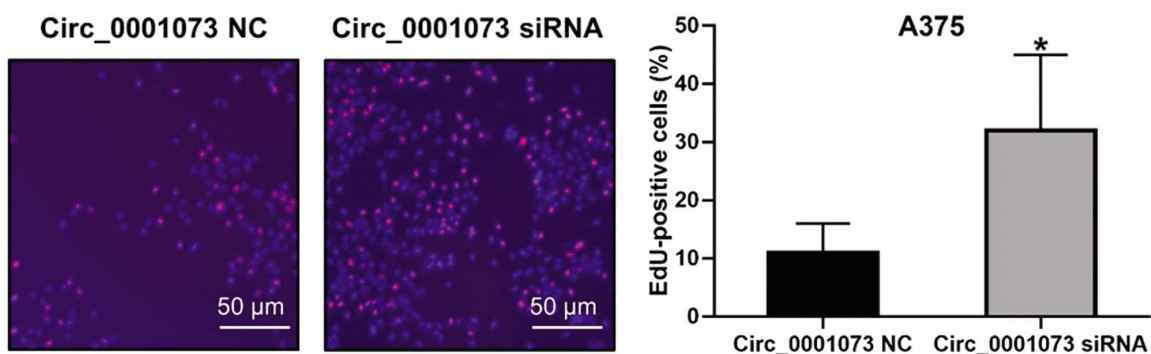


图 2 Circ\_0001073 抑制 A375 细胞增殖

Fig.2 Circ\_0001073 inhibits cell proliferation of A375 cells

Note: Data are expressed as  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ . Compared with Circ\_0001073 NC group, \* $P<0.05$ .

### 2.3 Circ\_0001073 抑制 A375 细胞克隆形成

克隆形成实验结果显示: Circ\_0001073 NC 组细胞克隆形成数目为  $37.435 \pm 7.366$ , Circ\_0001073 siRNA 组细胞克隆形成数目为  $141.535 \pm 18.322$ , 两组细胞克隆形成数目差异有统计学意义 (图 3,  $t=5.714$ ,  $P=0.011$ )。沉默 Circ\_0001073 后, 细胞克隆形成能力显著增强。

### 2.4 Circ\_0001073 抑制 A375 细胞迁移

细胞划痕实验结果显示: 与 0h 时细胞间隔距离相比, Circ\_0001073 NC 组细胞迁移距离百分比为  $32.136 \pm 6.843\%$ , Circ\_0001073 siRNA 组细胞迁移距离百分比为  $71.433 \pm 8.536$ , 两组细胞迁移距离差异有统计学意义 (图 4,  $t=3.733$ ,  $P=0.026$ )。沉默 Circ\_0001073 后, 细胞迁移能力显著增强。

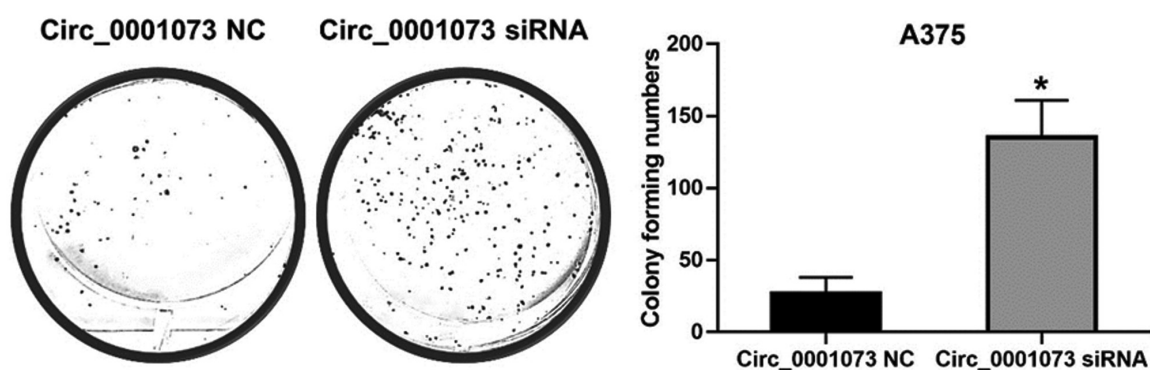


图3 Circ\_0001073 抑制 A375 细胞克隆形成能力

Fig.3 Circ\_0001073 inhibits colony forming ability of A375 cells

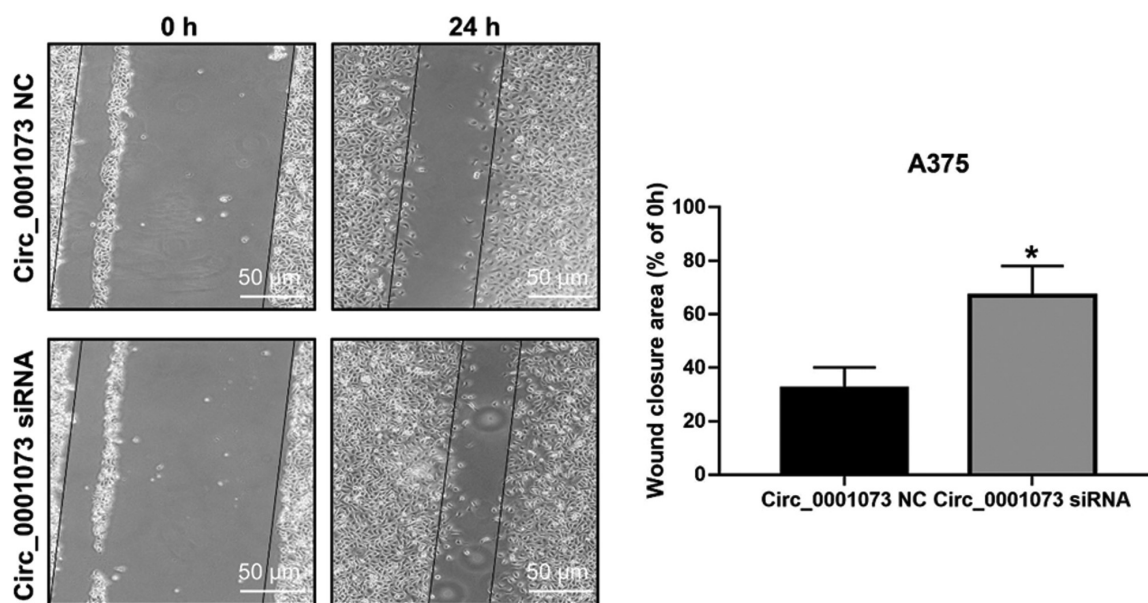
Note: Data are expressed as  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ . Compared with Circ\_0001073 NC group, \* $P<0.05$ .

图4 Circ\_0001073 抑制 A375 细胞迁移

Fig.4 Circ\_0001073 inhibits cell migration of A375 cells

Note: Data are expressed as  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ . Compared with Circ\_0001073 NC group, \* $P<0.05$ .

### 2.5 Circ\_0001073 抑制 A375 细胞侵袭

细胞侵袭实验结果显示: Circ\_0001073 NC 组侵袭细胞数目为  $103.433 \pm 7.642$ , Circ\_0001073 siRNA 组侵袭细胞数目为

$213.642 \pm 21.453$ , 两组侵袭细胞差异有统计学意义(图4,  $t=3.953$ ,  $P=0.021$ )。沉默 Circ\_0001073 后, 细胞侵袭能力显著增强。

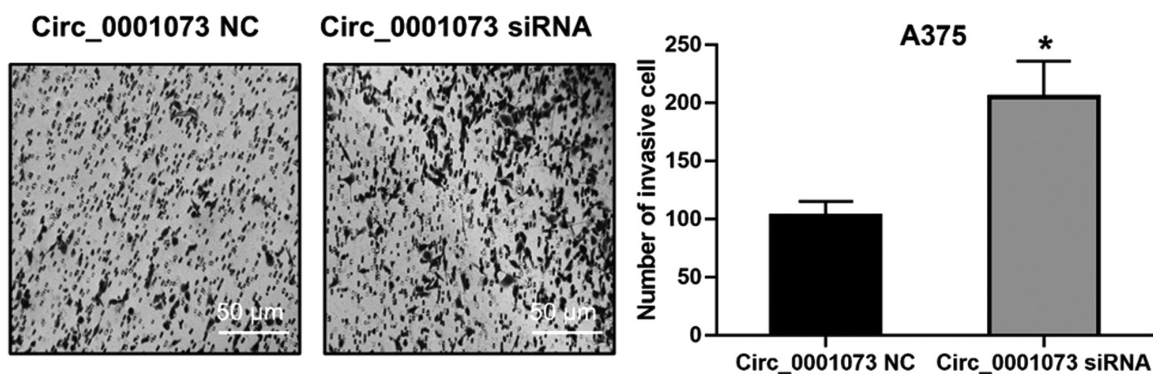


图5 Circ\_0001073 抑制 A375 细胞侵袭

Fig.5 Circ\_0001073 inhibits cell invasion of A375 cells

Note: Data are expressed as  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ . Compared with Circ\_0001073 NC group, \* $P<0.05$ .

## 3 讨论

恶性黑色素瘤是一类高度恶性、极易发生转移、高致死率的皮肤恶性肿瘤<sup>[7,8]</sup>。非编码 RNA 是一类不编码蛋白质的 RNA,

既往研究显示其主要成员 miRNA 和长链非编码 RNA 的异常表达与恶性黑色素瘤发生及进展关系密切<sup>[9,10]</sup>。环状 RNA 则是另一类在肿瘤发生及进展中发挥重要功能的非编码 RNA。近些年来,随着高通量测序和相关实验技术的进展,越来越多的证据表明环状 RNA 在多种肿瘤中异常表达,并与肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭及转移等恶性表型密切相关<sup>[11,12]</sup>。本研究中,我们检测了环状 RNA Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤细胞中的表达及功能。我们发现 Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤细胞中表达水平显著低于正常黑素细胞。细胞学实验结果显示:沉默 Circ\_0001073 表达后,A375 细胞克隆形成、增殖、迁移和侵袭能力均显著增强。本研究结果证实 Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤中是潜在的抑癌基因,为恶性黑色素瘤的靶向治疗提供了新的靶点。

越来越多的证据表明环状 RNA 在基因转录、蛋白翻译、蛋白的细胞浆和细胞核亚定位等多个重要生物进程中均发挥着至关重要的作用<sup>[13]</sup>。环状 RNA 可通过作为 miRNA 海绵、吸附结合 RNA 结合蛋白等多种机制参与调控相关癌基因或抑癌基因的表达<sup>[14,15]</sup>。例如:环状 RNA CircEPSTI1 可通过吸附结合 miR-4753 和 miR-6809 而调控三阴性乳腺癌的增殖和凋亡<sup>[16]</sup>。环状 RNA Cirs-7 可通过竞争性结合 miR-7 的表达而促进结肠癌进展<sup>[17]</sup>。环状 RNA Circ\_Foxo3 可作为 p21 蛋白和 CDK 蛋白的支架从而阻滞细胞周期<sup>[18]</sup>。新近研究表明,一些环状 RNA 在恶性黑色素瘤组织中表达异常,并与肿瘤的进展密切相关。环状 RNA Circ\_0025039 在恶性黑色素瘤组织和细胞中表达上调,并通过竞争性结合 miR-198 而上调 CDK 的表达,从而促进恶性黑色素瘤的增殖、侵袭和糖代谢<sup>[19]</sup>。另有研究证实,环状 RNA Circ\_0005320、Circ\_0067531、Circ\_0008042 在原位和转移性口腔黏膜黑色素瘤的表达要显著高于配对癌旁组织和非转移性口腔黏膜黑色素瘤,而 Circ\_0000869 和 Circ\_0000853 则在口腔黏膜黑色素瘤组织中表达下调<sup>[20]</sup>。生物信息学分析显示 Circ\_0005320、Circ\_0067531 和 Circ\_0000869 可作为 ceRNA 而调控口腔黏膜黑色素瘤的发生和转移。但是,与恶性黑色素瘤发生及进展密切相关的环状 RNA 鉴定出的仍不多,寻找恶性黑色素瘤靶向治疗的环状 RNA 靶点仍显得极为重要。

Circ\_0001073 在肿瘤中的表达及功能相关研究还不多。最新研究显示 Circ\_0001073 在膀胱癌组织和细胞中表达异常下调,与进展期临床病理特征呈负相关,并可作为判断膀胱癌患者术后生存周期的独立预测因子<sup>[6]</sup>。机制方面的研究显示 Circ\_0001073 可通过与 miR-626 结合而上调 EYA4 的表达,从而抑制膀胱癌细胞增殖和转移。与既往研究相符,我们的研究也发现 Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤细胞中的表达较正常黑素细胞明显降低。沉默 A375 细胞中 Circ\_0001073 的表达后,细胞增殖、克隆形成、侵袭和转移能力显著增强。我们的研究和既往研究均提示 Circ\_0001073 在肿瘤发生及进展中发挥抑癌基因的功能。但是,由于 Circ\_0001073 表达及功能的相关研究尚不多,而环状 RNA 的表达及功能具有极高的组织特异性,Circ\_0001073 在其他肿瘤中是否还会扮演癌基因的角色仍需更进一步研究确认。

既往研究显示 Circ\_0001073 含有多个 miRNA 结合位点,例如:miR-571、miR-548、miR-659、miR-626 翻译并诱导其降解。吸附结合 miRNA,从而解除相关 miRNA 对下游癌基因或

抑癌的抑制,是环状 RNA 参与调控肿瘤发生及进展的主要机制<sup>[14]</sup>。既往研究显示,miR-548 可通过抑制 NRIP1 的表达促进食管鳞状细胞癌的侵袭及转移,是潜在的癌基因<sup>[21]</sup>。我们猜想 Circ\_0001073 可能通过竞争性结合 miR-548 等促癌性 miRNA 而解除其对下游抑癌分子的抑制,进而抑制肿瘤的进展。因此,深入研究可与 Circ\_0001073 结合的相关促癌性 miRNAs 在恶性黑色素瘤发生及进展中的表达及功能,将有助于我们更深入的阐明 Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤中发挥抑癌基因功能的具体机制。

综上所述,Circ\_0001073 在恶性黑色素瘤细胞中的表达水平明显低于正常黑素细胞,沉默期表达后,A375 细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力均显著增强,是潜在的抑癌分子。本研究为恶性黑色素瘤靶向治疗提供了潜在的靶点,并为 Circ\_0001073 相关机制研究奠定了理论基础。

#### 参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34
- [2] Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019
- [3] 安丽凤, 鲁光宝, 刘海洲, 等. 蒙内酯对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 B16 黑色素瘤细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(11): 2032-2036
- [4] 苗嘉峰, 马小良, 裴卓, 等. 特定环状 RNA 表达与衰老的关系研究 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(01): 31-37
- [5] 时浩清, 岑晓渊, 张春雷, 等. 前列腺癌细胞系中环状 RNA circRNA-1565 的表达及鉴定 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(12): 2243-2247
- [6] Dong W, Bi J, Liu H, et al. Circular RNA ACVR2A suppresses bladder cancer cells proliferation and metastasis through miR-626/EYA4 axis[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 95
- [7] Bomar L, Senithilnathan A, Ahn C. Systemic Therapies for Advanced Melanoma[J]. Dermatol Clin, 2019, 37(4): 409-423
- [8] Amaria RN, Menzies AM, Burton EM, et al. Neoadjuvant systemic therapy in melanoma: recommendations of the International Neoadjuvant Melanoma Consortium[J]. Lancet Oncol, 2019, 20(7): e378-e389
- [9] Riefolo M, Porcellini E, Dika E, et al. Interplay between small and long non-coding RNAs in cutaneous melanoma: a complex jigsaw puzzle with missing pieces[J]. Mol Oncol, 2019, 13(1): 74-98
- [10] Thyagarajan A, Shaban A, Sahu RP. MicroRNA-Directed Cancer Therapies: Implications in Melanoma Intervention [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2018, 364(1): 1-12
- [11] Su M, Xiao Y, Ma J, et al. Circular RNAs in Cancer: emerging functions in hallmarks, stemness, resistance and roles as potential biomarkers[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 90
- [12] Shen B, Wang Z, Li Z, et al. Circular RNAs: an emerging landscape in tumor metastasis [J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(4): 630-643
- [13] 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
- [14] Dong Y, He D, Peng Z, et al. Circular RNAs in cancer: an emerging key player[J]. J Hematol Oncol, 2017, 10(1): 2

- 2017, 313(4): F926-F937
- [14] Qin C, Xiao C, Su Y, et al. Tisp40 deficiency attenuates renal ischemia reperfusion injury induced apoptosis of tubular epithelial cells [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359(1): 138-144
- [15] Han L, Ma Y, Qin JG, et al. The Renal Protective Effect of Jiangya-Tongluo Formula, through Regulation of Adrenomedullin and Angiotensin II, in Rats with Hypertensive Nephrosclerosis[J]. *Evid-based Compl Alt*, 2015, 2015: 428106
- [16] 韩琳, 秦建国, 高誉珊, 等. 降压通络方对高血压肾损害大鼠肾脏血管紧张素 II 及肾功能的影响[J]. *环球中医药*, 2015, 8(1): 36-41
- [17] 秦建国, 韩琳, 王媛媛, 等. 降压通络方对高血压肾损害大鼠肾上腺髓质素表达的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2015, 38(12): 801-805
- [18] 杨成, 任星峰, 彭隽. 普罗布考对肾脏缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及机制[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2017, 46(6): 660-664
- [19] 林乐迎, 符信清, 王庆志, 等. 自发性高血压大鼠窦房结细胞凋亡 [J]. *赣南医学院学报*, 2016, 36(1): 36-37
- [20] Balasubramanian S, Jansen M, Valerius M T, et al. Orphan nuclear receptor Nur77 promotes acute kidney injury and renal epithelial apoptosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(4): 674
- [21] Grgic I, Campanholle G, Bijol V, et al. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis[J]. *Kidney Int*, 2012, 82: 172-183
- [22] 于英奇, 郭士魁, 翁维良. 中国百年百名临床家丛书 (第 1 版)[M]. 北京: 北京中国中医药出版社, 2001: 315
- [23] 秦建国, 王亚红, 韩琳, 等. 降压通络方治疗早中期高血压肾损害临床经验[J]. *中华中医药学会第二十六次肾病分会学术交流会议论文集*, 2013, 11: 462-464
- [24] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541
- [25] Tait S. W. G, Green D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2010, 11(9): 621-632
- [26] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis[J]. *Cell Prolif*, 2012, 45: 487-498
- [27] He P, Zhou G, Qu D, et al. HBx inhibits proliferation and induces apoptosis via Fas/Fas L upregulation in rat renal tubular epithelial cells[J]. *J Nephrol*, 2013, 26(6): 1033-1041
- [28] Chen H, Huang RS, Yu XX, et al. Emodin protects against oxidative stress and apoptosis in HK-2 renal tubular epithelial cells after hypoxia/reoxygenation[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 447-452
- [29] 刘文涓, 王前, 李凤杰, 等. p-Akt-mTOR-p70S6K 信号通路蛋白与卵巢癌临床病理特征及化疗耐药的相关性[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2017, 42(8): 882-888
- [30] Long Q, Li X, He H, et al. Autophagy activation protects shock wave induced renal tubular epithelial cell apoptosis may through modulation of Akt/GSK-3  $\beta$  pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12 (12): 1461-1471

(上接第 1240 页)

- [15] Hsiao KY, Sun HS, Tsai SJ. Circular RNA - New member of noncoding RNA with novel functions [J]. *J Biotechnol*, 2017, 242 (11): 1136-1141
- [16] Chen B, Wei W, Huang X, et al. circEPSTI1 as a Prognostic Marker and Mediator of Triple-Negative Breast Cancer Progression [J]. *Theranostics*, 2018, 8(14): 4003-4015
- [17] Weng W, Wei Q, Toden S, et al. Circular RNA ciRS-7-A Promising Prognostic Biomarker and a Potential Therapeutic Target in Colorectal Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(14): 3918-3928
- [18] Du WW, Yang W, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): 2846-2858
- [19] Bian D, Wu Y, Song D, et al. Novel circular RNA, hsa\_circ\_0025039 promotes cell growth, invasion and glucose metabolism in malignant melanoma via the miR-198/CDK4 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108(2018): 165-176
- [20] Ju H, Zhang L, Mao L, et al. Altered expression pattern of circular RNAs in metastatic oral mucosal melanoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(9): 1788-1800
- [21] Ni XF, Zhao LH, Li G, et al. MicroRNA-548-3p and MicroRNA-576-5p enhance the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells via NR1P1 down-regulation[J]. *Neoplasma*, 2018, 65(6): 881-887