·口腔科专栏·

circ_0086414 通过 miR-498/PCK1 轴对口腔鳞状细胞癌生物学行为的影响

李立恒[1]，王 蕊[1]，王晓明[1]，张智轶[1]，张 璇[1]，张 凡[2]

（1.河北北方学院附属第一医院口腔科，河北 张家口 075000；2.河北北方学院附属第一医院病理科，河北 张家口 075000）

［摘要］ 目的 研究 circ_0086414 通过 miR-498/PCK1 轴对口腔鳞状细胞癌（oral squamous cell carcinomas，OSCC）生物学行为的影响。**方法** 收集手术切除的 OSCC 组织及配对的癌旁组织 27 对，实时荧光定量 PCR（real-time quantitative PCR，qRT-PCR）检测组织中 circ_0086414 和 PCK1 的表达。将 SJG-1 细胞分为 pcDNA 组、pcDNA circ_0086414 组、miR-498 NC 组、miR-498 mimic 组、OE-NC 组、OE-PCK1 组、miR-498 NC＋pcDNA 组、miR-498 NC＋pcDNA circ_0086414 组、miR-498 mimic＋pcDNA 组、miR-498 mimic＋pcDNA circ_0086414 组，细胞计数试剂盒（cell counting kit，CCK8）法检测 SJG-1 细胞增殖，流式细胞术检测 SJG-1 细胞凋亡，Transwell 实验检测 SJG-1 细胞侵袭；蛋白免疫印迹（Western blot，WB）实验检测上皮间质转化情况，双荧光素酶报告基因检测 circ_0086414 和 miR-498 及 miR-498 和 PCK1 的关系。**结果** 与癌旁组织比较，OSCC 组织中 circ_0086414 相对表达明显降低（$P<0.001$）；与人正常口腔角质细胞 HOK 比较，人 OSCC 细胞系 HEK293T、SJG-1、SCC-15、HSC-2 中 circ_0086414 相对表达显著降低（$P<0.001$）；与 pcDNA 组比较，pcDNAcirc_0086414 组 SJG-1 细胞增殖能力明显降低，凋亡率明显升高，侵袭能力明显减少，N-cadherin 表达水平显著减少，E-cadherin 表达水平明显升高（均$P<0.001$）；与 miR-498 NC 组比较，miR-498mimic 组 SJG-1 细胞增殖能力明显升高，凋亡率显著降低，侵袭能力明显增加，N-cadherin 表达水平显著增加，E-cadherin 表达水平明显减少（均$P<0.001$）；与 miR-498 NC＋pcDNA 组比较，miR-498 NC＋pcDNAcirc_0086414 组 SJG-1 细胞增殖能力明显降低，凋亡率明显升高，侵袭能力明显降低，N-cadherin 表达水平明显降低，E-cadherin 表达水平明显升高，miR-498 mimic＋pcDNA 组 SJG-1 细胞增殖能力明显升高，凋亡率明显降低，细胞侵袭能力明显升高，N-cadherin 表达水平明显升高，E-cadherin 表达水平明显降低（均$P<0.001$），与 miR-498 mimic＋pcDNA 组比较，miR-498 mimic＋pcDNAcirc_0086414 组的 SJG-1 细胞增殖能力明显降低，凋亡率明显升高，侵袭能力明显降低，N-cadherin 表达水平明显降低，E-cadherin 的表达水平明显升高（均$P<0.001$）；与 OE-NC 组比较，OE-PCK1 组 SJG-1 细胞增殖能力明显降低，凋亡率明显升高，细胞侵袭能力明显减少，N-cadherin 表达水平显著减少，E-cadherin 表达水平明显升高，PCK1 的相对表达量明显升高（均$P<0.001$）。**结论** circ_0086414 在 OSCC 细胞和组织中的表达下调，过表达 circ_0086414 抑制 OSCC 细胞的恶性行为。通过调控 miR-498/PCK1 轴刺激细胞凋亡，为探索 OSCC 诊断和治疗的生物标志物提供有意义的实验依据，为 OSCC 的治疗提供新的诊疗思路。

［关键词］ 口腔肿瘤；癌，鳞状细胞；RNA，环状 doi：10.3969/j.issn.1007-3205.2024.04.010

［中图分类号］ R739.8 **［文献标志码］** A **［文章编号］** 1007-3205(2024)04-0424-10

Effect of circ_0086414 on biological behavior of oral squamous cell carcinoma via miR-498/PCK1 axis

LI Li-heng[1], WANG Rui[1], WANG Xiao-ming[1], ZHANG Zhi-yi[1], ZHNG Xuan[1], ZHANG Fan[2]

(1.*Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou* 075000, *China*; 2.*Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou* 075000, *China*)

［收稿日期］2023－05－05

［基金项目］河北省医学科学研究课题计划（20210802）

［作者简介］李立恒（1982－），男，河北保定人，河北北方学院附属第一医院主治医师，医学学士，从事颌面外科肿瘤诊治研究。

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of circ_0086414 on biological behavior of oral squamous cell carcinoma (OSCC) via miR-498/PCK1 axis. **Methods** In total, 27 pairs of surgically resected OSCC tissues and paired paracancerous tissues were collected. Real-time quantitative PCR(qRT-PCR) was used to detect the expression of circ_0086414 and PCK1 in tissues. SJG-1 cells were divided into pcDNA group, pcDNA circ_0086414 group, miR-498 NC group, miR-498 mimic group, OE-NC group, OE-PCK1 group, miR-498 NC+pcDNA group, miR-498 NC + pcDNA circ_0086414 group, miR-498 mimic + pcDNA group, and miR-498 mimic+pcDNA circ_0086414 group. Cell counting kit (CCK8) was used to detect SJG-1 cell proliferation. Flow cytometry was used to detect SJG-1 cell apoptosis, and Transwell assay was used to detect SJG-1 cell invasion. Western bloting (WB) assay was used to detect epithelial messtimal transformation. The relationship between circ_0086414 and miR-498 and between miR-498 and PCK1 was detected by dual luciferase reporter gene. **Results** The relative expression of circ_0086414 in OSCC tissues was significantly lower than that in paracancerous tissues ($P<0.001$). Compared with HOK in normal human oral keratinocytes, the expression of circ_0086414 in human OSCC cell lines HEK293T, SJG-1, SCC-15 and HSC-2 was significantly decreased ($P<0.001$). Compared with pcDNA group, SJG-1 cells in pcDNAcirc_0086414 group had significantly decreased proliferation ability, significantly increased apoptosis rate, significantly decreased invasion ability, and there was significantly decreased N-cadherin expression level, and significantly increased E-cadherin expression level ($P<0.001$). Compared with miR-498 NC group, miR-498mimic group had significantly increased proliferation ability, significantly decreased apoptosis rate and significantly increased invasion ability in SJG-1 cells, as well as significantly increased expression level of N-cadherin, and significantly decreased expression level of E-cadherin (all $P<0.001$). Compared with the miR-498 NC+pcDNA group, the proliferation ability of SJG-1 cells in the miR-498 NC + pcDNAcirc_0086414 group was decreased significantly, the apoptosis rate was increased significantly, and the invasion ability was decreased significantly. The expression level of N-cadherin was decreased significantly, and the expression level of E-cadherin was increased significantly. The proliferation ability of SJG-1 cells in miR-498 mimic + pcDNA group was increased significantly, the apoptosis rate was decreased significantly, and the cell invasion ability was increased significantly. The expression level of N-cadherin was increased significantly, while the expression level of E-cadherin was significantly decreased (all $P<0.001$). Compared with the miR-498 mimic+pcDNA group, the proliferation capacity of SJG-1 cells in miR-498 mimic + pcDNAcirc_0086414 group was significantly reduced, the apoptosis rate was significantly increased, and the invasion ability was significantly decreased. The expression level of N-cadherin was significantly decreased, while the expression level of E-cadherin was significantly increased (all $P<0.001$). Compared with the OE-NC group, the proliferation ability of SJG-1 cells in the OE-PCK1 group was significantly decreased, the apoptosis rate was significantly increased, and the invasion ability of SJG-1 cells was significantly decreased. The expression level of N-cadherin was significantly decreased, the expression level of E-cadherin was significantly increased, and the relative expression level of PCK1 was significantly increased (all $P<0.001$). **Conclusion** The expression of circ_0086414 is down-regulated in OSCC cells and tissues, and overexpression of circ_0086414 inhibits the malignant behavior of OSCC cells. By regulating the miR-498/PCK1 axis to stimulate apoptosis, it provides a meaningful experimental basis for exploring biomarkers for diagnosis and treatment of OSCC, and provides a new diagnosis and treatment idea for OSCC.

[**Key words**] oral neoplasms; carcinoma, squamous cell; RNA, circular

头颈部鳞状细胞癌是导致肿瘤发病和死亡的主要原因，所有的头颈部鳞状细胞癌病例中，约有90%是口腔鳞状细胞癌（oral squamous cell carcinomas，OSCC）[1]，这是一种常见的癌症。青年人群中OSCC的发病率明显呈现上升趋势，吸烟、饮酒、人乳头瘤病毒感染等都可能是加重OSCC发病风险的因素[2]。尽管医疗技术水平不断的进步，手术、放疗和化疗仍是治疗OSCC的主要手段，但是该病的5年生存率并没有得到有效的改善[3]。因此，进一步探索OSCC的发病机制和潜在的分子治疗靶点非常重要。许多学者聚焦于异常表达的环状RNA（circular RNAs，circRNAs）参与调控OSCC的发生和发展，并取得了许多新的进展[4]。circRNAs不仅广泛调控细胞活动，而且与肿瘤发生和肿瘤进展相关[5]。然而，circRNAs在OSCC中的作用尚不清楚。miRNA是长度为18～25个核苷酸的非编码RNA，miRNA通过靶向调控mRNA的30个非翻译区的互补作用来调控基因表达[6]。miRNAs被发现参与细胞增殖、转移、分化和自噬，其异常表达参与肿瘤的发生和发展。相关研究表明，miR-498通过靶向抑制PCK1表达促进口腔鳞癌细胞增殖、迁移、侵袭，抑制细胞凋亡[7]。也有研究表明，口腔鳞癌组织中hsa_circ_0086414的表达量相对于其配对的对照组组织低表达，与肿瘤TNM分期、肿瘤大小及淋巴结是否有转移存在显著的相关性[8]，所以表明circRNAs和miRNAs均有可能参与OSCC的发生和发展。因此本研究探究has_circ_0086414在OSCC组织和细胞中的表达及其对OSCC的影响，以及has_circ_0086414通过miR-498/PCK1轴对OSCC的影响，以期为OSCC的研究提供新的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和细胞 收集2022年4—12月我院收治的进行手术切除的OSCC组织及配对的癌旁组织27对，样本储存于液氮中，组织采集经过患者及家属的知情同意，人正常口腔角质细胞HOK和人OSCC细胞系HEK293T、SJG-1、SCC-15、HSC-2均购自美国典型菌种保藏中心。

本研究经医院伦理委员会批准同意[批准文号：伦审第(2022-29)号]。

1.2 试剂和仪器 空载体质粒（pcDNA）和circ_0086414过表达载体（pcDNA circ_0086414）购自广州锐博生物技术有限公司；阴性对照（miR-NC）、miR-498模拟物（miR-498 mimics）、阴性对照（OE-NC）和PCK1过表达物（OE-PCK1）均购自美国ThermoFisher公司；CCK8试剂购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司，PVDF膜购自美国Sigma公司，CCK-8试剂、BCA蛋白定量试剂盒购自美国Thermo公司，N-cadherin和E-cadherin抗体购自美国sigma公司，HRP标记的羊抗兔二抗购自美国Proteintech公司。细胞培养箱购自美国Thermo Fisher公司，凝胶成像系统、蛋白电泳仪、蛋白转膜仪均购自美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将人正常口腔角质细胞HOK和人OSCC细胞系HEK293T、SJG-1、SCC-15、HSC-2置于含100 mg/L链霉素、100 mg/L青霉素和10%的胎牛血清的培养基中培养，并在37 ℃、5% CO_2孵育箱中培养。

1.3.2 细胞实验分组 将SJG-1细胞分为pcDNA组（转染pcDNA，阴性对照）、pcDNA circ_0086414组（转染pcDNA circ_0086414，过表达circ_0086414）、miR-498 NC组（转染miR-498 NC，阴性对照）、miR-498 mimic组（转染miR-498 mimic，过表达miR-498 mimic）、OE-NC组（转染OE-NC，阴性对照）、OE-PCK1组（转染OE-PCK1，过表达PCK1）、miR-498 NC＋pcDNA组（共转染miR-498 NC和pcDNA）、miR-498 NC＋pcDNA circ_0086414组（共转染miR-498 NC和pcDNA circ_0086414）、miR-498 mimic＋pcDNA组（共转染miR-498 mimic和pcDNA）、miR-498 mimic＋pcDNA circ_0086414组（共转染miR-498 mimic和pcDNA circ_0086414）。利用Lipofectamine 3000将上述质粒转染SJG-1细胞中。转染48 h后收集细胞进行后续实验。

1.3.3 qRT-PCR检测circ_0086414和PCK1的表达 采用Trizol试剂从OSCC组织、人正常口腔角质细胞HOK和人OSCC细胞系HEK293T、SJG-1、SCC-15、HSC-2细胞及转染后各组SJG-1细胞中提取总RNA，采用反转试剂盒将RNA反转为cDNA，荧光实时定量PCR上机，使用以下引物，引物序列见表1。qRT-PCR扩增反应体系设定为20 μL，GoTaq qPCR Master Mix为10 μL，cDNA为1 μL，正向和反向引物各0.4 μL，Nuclease-Free Water为8.2 μL。qRT-PCR反应条件如下：95 ℃预变性5min，循环：95 ℃变性15 s，58 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，共40个循环；72 ℃继续延伸10 min

扩增完成。$2^{-\triangle\triangle CT}$表示目的基因的相对表达量，并行统计学分析。

表1　引物序列

Table 1　Primers sequence

基因名称	正向引物	反向引物
circ_0086414	5′-CCGAAGCCGAGACAGGATG-3′	5′-CGCAGAAACTGCTGAAGGGT-3′
PCK1	5′-GGTCTCATTGCTCAAGTGTAATCG-3′	5′-ACAACCATGGACACCCTCAACTCT-3′

1.3.4　CCK-8法检测SJG-1细胞增殖　将各组转染48 h后的SJG-1细胞以2×10^3个细胞/孔接种于96孔板中，每孔含200 μL的培养基。置于细胞培养箱中预培养45 h，每组细胞均加入10 μL CCK-8试剂，培养4 h，使用酶标仪检测细胞在OD 490吸光值。细胞增殖率(%)＝OD490实验组/ OD490对照组×100%。

1.3.5　流式细胞术检测SJG-1细胞凋亡　将各组转染48 h后的SJG-1细胞重新悬浮，以5×10^4个加入胰蛋白酶和DMEM培养基进行消化和终止消化。PBS溶液反复洗涤离心2次，重悬细胞，制备密度为5×10^5。每管加入500 μL结合缓冲液、5 μL的AnnexinV- FITC和5 μL的PI。室温下避光15 min，上流式细胞仪，根据说明书检测细胞凋亡率。

1.3.6　Transwell实验检测SJG-1细胞侵袭　将Transwell小室放入24孔板，将基质胶涂在Transwell上室中，待自然干燥后，将细胞以5×10^4个/mL的密度接种于涂有基质胶的上室中，在下室加入500 μL含10%血清的培养基，在37 ℃恒温孵箱培养36 h，吸去上室内无血清培养基，用湿棉签檫去上室底膜细胞，PBS清洗，4%的多聚甲醛室温固定30 min，PBS清洗，每孔加入约500 μL 0.1%的结晶紫染液，室温染色30 min，取出小室吸液体，倒置显微镜下观察拍照，显微镜下取5个随机视野，用Image J软件分析计数。

1.3.7　Western blot检测上皮间质转化情况　使用RIPA裂解缓冲液提取总蛋白，并用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白质浓度，蛋白样品以40 mg/孔加载，并进行SDS-PAGE。然后将蛋白质转移到PVDF膜，用5%脱脂牛奶将其封存2 h，然后与一抗N-cadherin(以1∶5 000稀释)和E-cadherin(以1∶10 000稀释)在4 ℃下孵育过夜。第2天，TBST溶液冲洗膜后，加入HRP标记的羊抗兔二抗，室温下孵育1 h，最后在暗室中进行ECL化学发光，Image软件对灰度值进行量化分析。

1.3.8　双荧光素酶报告基因检测circ_0086414和miR-498及miR-498和PCK1的关系　通过circinteractome和TargetScan预测circ_0086414和miR-498及miR-498和PCK1的潜在结合位点。将野生型(WT)或突变型(MUT) circ_0086414和PCK1 3′UTRpmiRGlO荧光素酶报告载体中，分别命名为circ_0086414 WT、circ_0086414 MUT、PCK1 WT和PCK1 MUT，分别和miR-NC、miR-498 mimics转染到SJG-1细胞中，48 h后，采用双荧光素酶报告系统检测荧光素酶活性。

1.4　统计学方法　应用GraphPadPrism9统计软件处理数据。计量资料比较采用独立样本t检验、单因素方差分析和SNK-q检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　circ_0086414在OSCC组织和细胞中的表达　qRT-PCR检测结果显示，癌组织和癌旁组织circ_0086414相对表达分别为0.49±0.07和1.98±0.16，与癌旁组织比较，OSCC组织中circ_0086414相对表达明显降低，差异有统计学意义($t=22.572$，$P<0.001$)。与人正常口腔角质细胞HOK比较，人OSCC细胞系HEK293T、SJG-1、SCC-15、HSC-2中circ_0086414相对表达显著降低，差异有统计学意义($P<0.001$)，而且circ_0086414相对表达在SJG-1细胞中表达最低，所以选择SJG-1细胞作为本研究对象。见表2。

表2　circ_0086414在OSCC细胞中的表达

Table 2　Expression of circ 0086414 in OSCC cells

($n=10$，$\bar{x}\pm s$)

组别	circ_0086414相对表达
人正常口腔角质细胞HOK	2.13±0.57
人OSCC细胞系HEK293T	0.39±0.08*
人OSCC细胞系SJG-1	0.26±0.07*
人OSCC细胞系SCC-15	0.42±0.11*
人OSCC细胞系HSC-2	0.51±0.05*
F值	86.950
P值	<0.001

*P值<0.05与人正常口腔角质细胞HOK比较(SNK-q检验)

2.2　circ_0086414对OSCC细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化的影响　CCK-8法检测结果显示(图1A)，与pcDNA组比较，pcDNAcirc_0086414组SJG-1细胞增殖率明显降低，差异有统计学意义($P<0.001$)；流式细胞术结果显示(图1B)，与

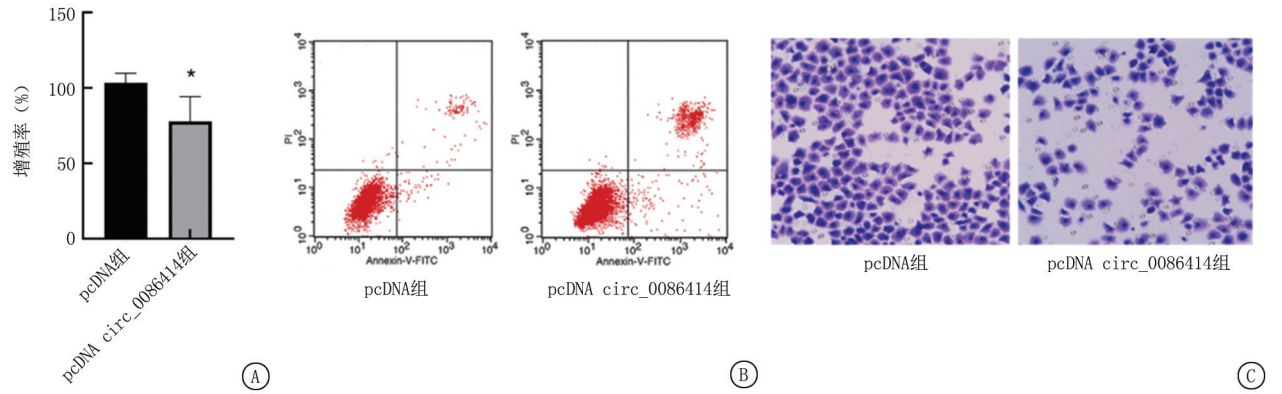
pcDNA组比较，pcDNAcirc_0086414组SJG-1细胞凋亡率明显升高，差异有统计学意义（$P<0.001$）；Transwell实验检测结果显示（图1C），与pcDNA组比较，pcDNAcirc_0086414组SJG-1细胞侵袭能力明显减少，差异有统计学意义（$P<0.001$）；Western blot分析结果显示（图1D），与pcDNA组比较，pcDNAcirc_0086414组N-cadherin的表达水平显著减少，E-cadherin水平明显升高，差异有统计学意义（$P<0.001$）。见表3。

表3　pcDNA组和pcDNA circ_0086414组OSCC细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化比较

Table 3　Comparison of proliferation, apoptosis, invasion, and epithelial mesenchymal transition of OSCC cells between pcDNA group and pcDNA circ_0086414 group

（$n=10, \bar{x}\pm s$）

组别	增殖率（%）	凋亡率（%）	侵袭数量（个）	相对蛋白表达	
				N-cadherin	E-cadherin
pcDNA组	103.46±11.79	5.64±1.25	137.82±26.73	1.69±0.57	0.59±0.11
pcDNA circ_0086414组	77.81±8.73	42.18±6.69	46.69±7.81	0.35±0.08	1.86±0.63
t 值	5.529	16.978	10.348	7.362	6.279
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



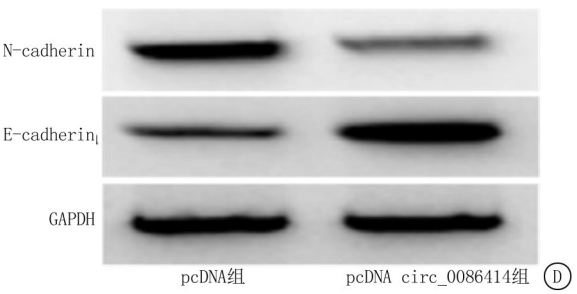


图1　circ_0086414对OSCC细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化的影响

A.circ_0086414对细胞增殖的影响；B.circ_0086414对细胞凋亡的影响；C.circ_0086414对细胞侵袭的影响（结晶紫染色，Scalebar=25 μm，×400）；D.circ_0086414对细胞上皮间质转化的影响

Figure 1　Effects of circ_0086414 on OSCC cell proliferation, apoptosis, invasion and epithelial mesenchymal transformation

2.3　circ_0086414和miR-498的关系　circinteractome数据库提供了circ_0086414和miR-498之间的结合位点（图2）。双荧光素酶报告基因检测结果显示，miR-498 mimic组circ_0086414 WT的荧光素酶活性明显低于miR-498NC组，差异有统计学意义（$P<0.001$），而circ_0086414 MUT的荧光素酶活性未发生显著的改变，差异无统计学意义（$P>0.05$），见表4。

TargetScan miRNA predictions						
CircRNA Mirbase ID	CircRNA (Top) - miRNA (Bottom) pairing	Site Type	CircRNA Start	CircRNA End	3' pairing	local AU
hsa_circ_0086414 (5' ... 3') hsa-miR-498 (3' ... 5')	CUACAGGAACGUUCACUUGAAAG CUUUUUGCGGGGGACCGAACUUU	7mer-1a	1899	1905	0.004	0.031

图2　circinteractome数据库预测circ_0086414和miR-498的结合位点

Figure 2　Circinteractome database in predicting binding sites of circ_0086414 and miR－498

表4 荧光素酶活性

Table 4　Luciferase activity

（$n=10, \bar{x}\pm s$）

组别	circ_0086414 WT	circ_0086414 MUT
miR-498 NC组	1.02±0.09	1.03±0.11
miR-498 mimic组	0.45±0.03	1.01±0.05
t 值	19.000	0.523
P 值	<0.001	0.304

2.4　miR-498对OSCC细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化的影响　CCK-8法检测结果显示（图3A），与miR-498 NC组比较，miR-498 mimic组SJG-1细胞增殖率明显升高，差异有统计学意义（$P<0.001$）；流式细胞术结果显示（图3B），与miR-498 NC组比较，miR-498 mimic组SJG-1细胞凋亡率显著降低，差异有统计学意义$P<0.05$）；Transwell实验检测结果显示（图3C），与miR-498 NC组比较，miR-498 mimic组SJG-1细胞侵袭数量明显增加，差异有统计学意义（$P<0.001$）；Western blot分析结果显示（图3D），与miR-498 NC组比较，miR-498 mimic组的N-cadherin的表达水平显著增加，E-cadherin水平明显减少，差异有统计学意义（$P<0.001$）。见表5。

表5　miR-498 NC组和miR-498 mimic组OSCC细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化比较

Table 5　Comparison of proliferation, apoptosis, invasion, and epithelial mesenchymal transition of OSCC cells between miR-498 NC group and miR-498 mimic group

（$n=10, \bar{x}\pm s$）

组别	增殖率（%）	凋亡率（%）	侵袭数量（个）	相对蛋白表达	
				N-cadherin	E-cadherin
miR-498 NC组	101.78±12.29	13.84±2.96	51.86±9.25	0.51±0.06	1.67±0.11
miR-498 mimic组	153.19±16.31	7.18±1.14	142.73±21.76	1.92±0.49	0.39±0.04
t 值	7.961	6.639	12.153	9.032	34.582
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

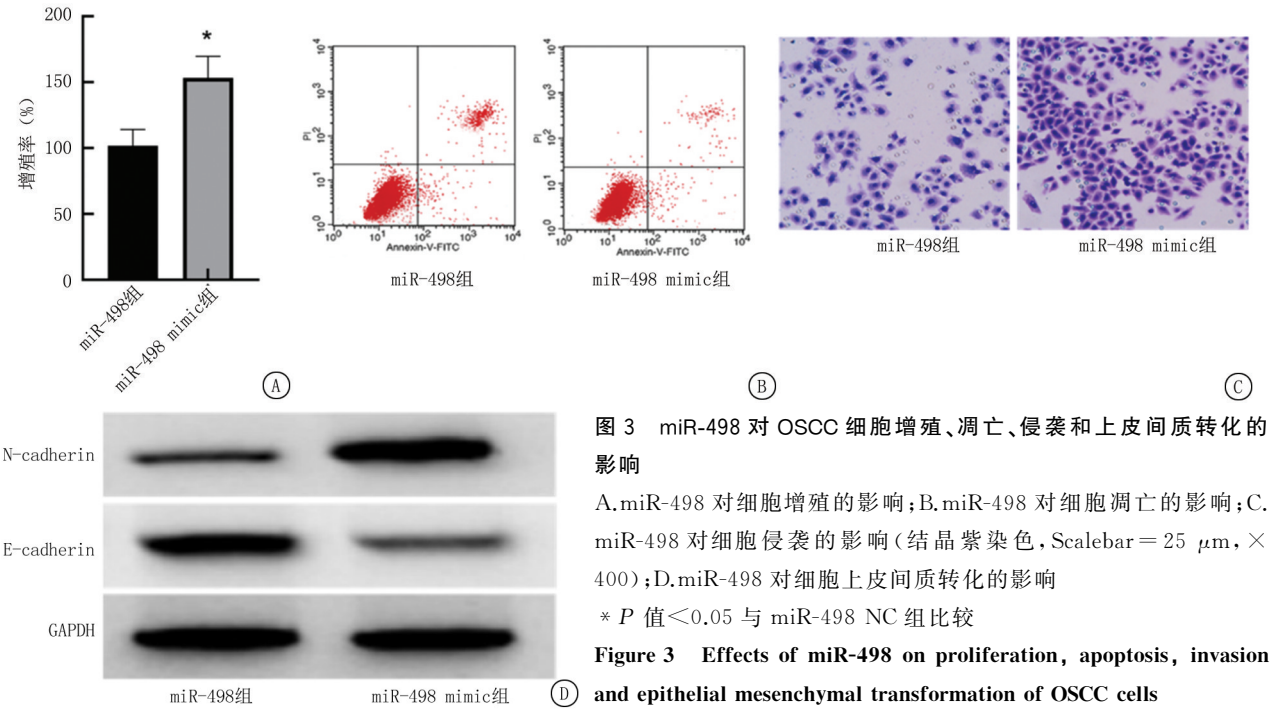


图3　miR-498对OSCC细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化的影响

A.miR-498对细胞增殖的影响；B.miR-498对细胞凋亡的影响；C.miR-498对细胞侵袭的影响（结晶紫染色，Scalebar=25 μm，×400）；D.miR-498对细胞上皮间质转化的影响

* P 值<0.05与miR-498 NC组比较

Figure 3　Effects of miR-498 on proliferation, apoptosis, invasion and epithelial mesenchymal transformation of OSCC cells

2.5　miR-498通过circ_0086414对OSCC细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化的影响　CCK-8法检测结果显示（图4A），与miR-498 NC+pcDNA组比较，miR-498 NC+pcDNAcirc_0086414组SJG-1细胞增殖率明显降低，miR-498 mimic+pcDNA组SJG-1细胞增殖率明显升高，差异有统计学意义（$P<0.001$）；与miR-498 mimic+pcDNA组比较，miR-498 mimic+pcDNAcirc_0086414组的SJG-1细胞增殖率明显降低，差异有统计学意义（$P<0.001$）；流式细胞术结果显示（图4B），与miR-498 NC+pcDNA组比较，miR-498 NC+pcDNAcirc_0086414组SJG-1细胞凋亡率明显升高，miR-498 mimic+pcDNA组SJG-1细胞凋亡率明显降低，差异有统计学意义（$P<0.001$），与miR-498 mimic+pcDNA组比较，miR-498 mimic+pcDNAcirc_0086414组的SJG-1细胞凋亡率明显升高，差异有

统计学意义（$P<0.001$）；Transwell 实验检测结果显示（图 4C），与 miR-498 NC＋pcDNA 组比较，miR-498NC＋pcDNAcirc_0086414 组 SJG-1 细胞侵袭数量明显降低，miR-498 mimic＋pcDNA 组 SJG-1细胞侵袭数量明显升高，差异有统计学意义（$P<0.001$），与 miR-498mimic＋pcDNA 组比较，miR-498 mimic＋pcDNAcirc_0086414 组的 SJG-1 细胞侵袭数量明显降低，差异有统计学意义（$P<0.001$）；Western blot 分析结果显示（图 4D），与 miR-498 NC＋pcDNA 组比较，miR-498 NC＋pcDNAcirc_0086414 组 N-cadherin 的表达水平明显降低，miR-498 mimic＋pcDNA 组 N-cadherin 的表达水平明显升高，差异有统计学意义（$P<0.001$），与 miR-498mimic＋pcDNA 组比较，miR-498 mimic＋pcDNAcirc_0086414 组的 N-cadherin 的表达水平明显降低，差异有统计学意义（$P<0.001$）；与 miR-498 NC＋pcDNA 组比较，miR-498 NC＋pcDNAcirc_0086414 组 E-cadherin 的表达水平明显升高，miR-498 mimic＋pcDNA 组 E-cadherin 的表达水平明显降低，差异有统计学意义（$P<0.001$），与 miR-498 mimic＋pcDNA 组比较，miR-498 mimic＋pcDNAcirc_0086414 组的 E-cadherin的表达水平明显升高，差异有统计学意义（$P<0.001$）。见表 6。

表 6　各组 OSCC 细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化的影响

Table 6　Comparison of proliferation, apoptosis, invasion, and epithelial mesenchymal transition of OSCC cells in each group

（$n=10, \bar{x}\pm s$）

组别	增殖率（%）	凋亡率（%）	侵袭数量（个）	相对蛋白表达	
				N-cadherin	E-cadherin
miR-498 NC＋pcDNA 组	101.78±11.21	13.61±2.74	82.87±8.63	1.58±0.46	1.05±0.11
miR-498 NC＋pcDNA circ_0086414 组	81.73±9.19*	48.57±7.18*	36.93±4.42*	0.42±0.07*	2.39±0.72*
miR-498 mimic＋pcDNA 组	139.85±18.27*	7.06±1.42*	149.27±22.48*	2.67±0.75*	0.36±0.08*
miR-498 mimic＋pcDNA circ_0086414 组	80.80±9.22#	16.79±4.53#	56.73±15.84#	0.79±0.11#	1.79±0.53#
F 值	48.530	167.600	112.800	50.110	38.090
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* *P* 值<0.05 与 miR-498 NC＋pcDNA 组比较　# *P* 值<0.05 与 miR-498 mimic＋pcDNA 组比较（SNK-*q* 检验）

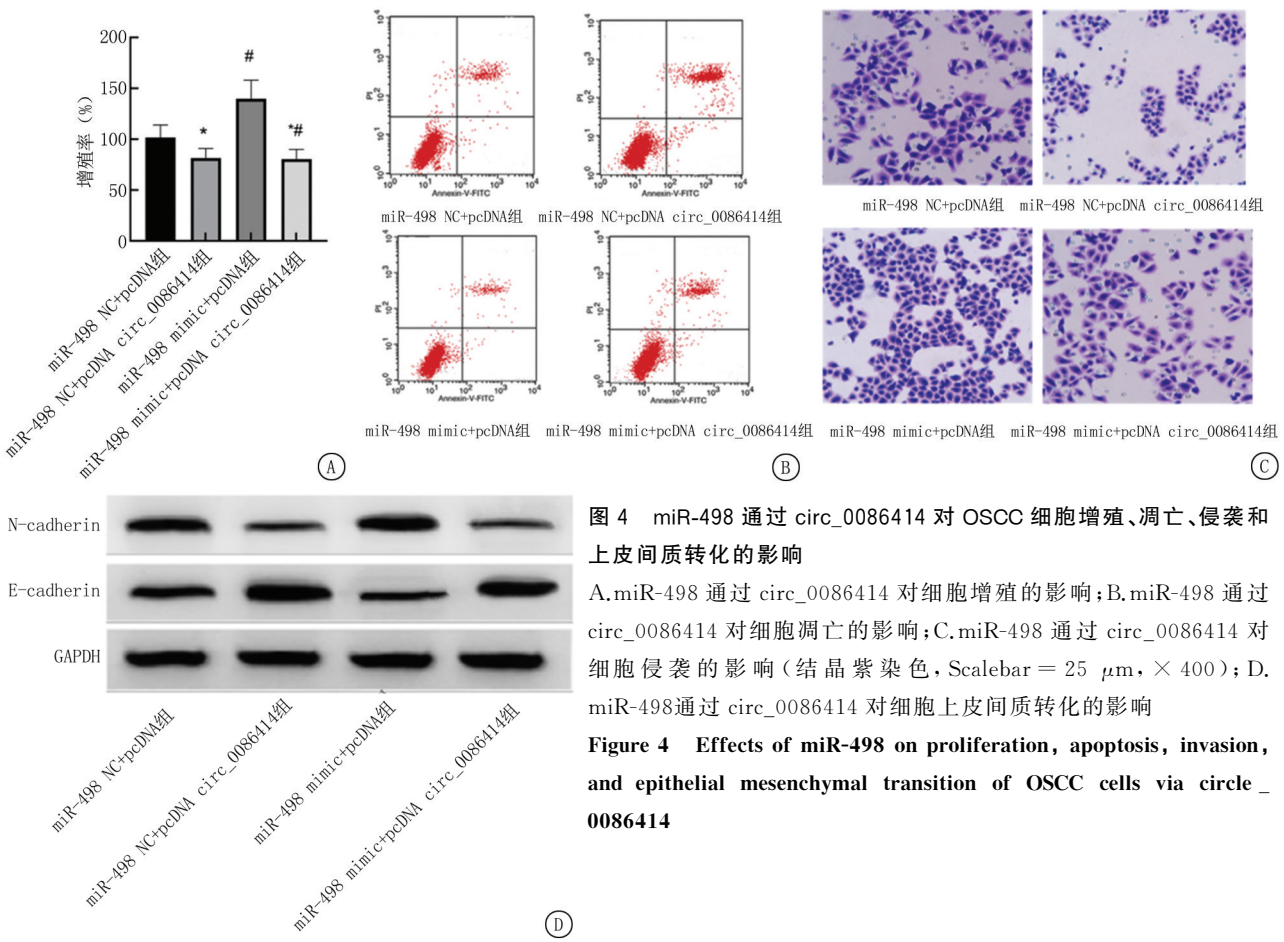


图 4　miR-498 通过 circ_0086414 对 OSCC 细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化的影响

A.miR-498 通过 circ_0086414 对细胞增殖的影响；B.miR-498 通过 circ_0086414 对细胞凋亡的影响；C.miR-498 通过 circ_0086414 对细胞侵袭的影响（结晶紫染色，Scalebar＝25 μm，×400）；D.miR-498通过 circ_0086414 对细胞上皮间质转化的影响

Figure 4　Effects of miR-498 on proliferation, apoptosis, invasion, and epithelial mesenchymal transition of OSCC cells via circle_0086414

2.6　miR-498 和 PCK1 的关系　使用 TargetScan 预测 miR-498 与 PCK1 之间的结合位点(图 5)。采用双荧光素酶报告基因检测确认 PCK1 能否直接与 miR-498 结合，结果显示，miR-498 mimic 组的 PCK1 WT 的荧光素酶活性明显低于 miR-498 NC 组，差异有统计学意义($P<0.001$)，而 PCK1 MUT 的荧光素酶活性未发生显著的改变，差异无统计学意义($P>0.05$)，见表 7。

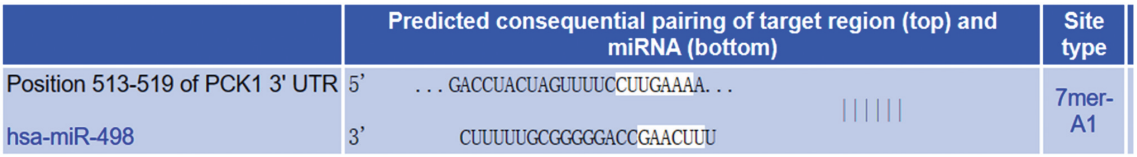


图 5　生信软件预测 miR-498 和 PCK1 的结合位点

Figure 5　Bioinformatics software in predicting binding sites of miR-498 and PCK1

表 7　荧光素酶活性

Table 7　Luciferase activity

($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	PCK1 WT	PCK1 MUT
miR-498 NC 组	1.01±0.10	1.02±0.09
miR-498 mimic 组	0.43±0.05	1.01±0.07
t 值	16.405	0.277
P 值	<0.001	0.392

2.7　PCK1 对 OSCC 细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化的影响　CCK-8 法检测结果显示(图 6A)，与 OE-NC 组比较，OE-PCK1 组 SJG-1 细胞增殖率明显降低，差异有统计学意义($P<0.001$)；流式细胞术结果显示(图 6B)，与 OE-NC 组比较，OE-PCK1 组 SJG-1 细胞凋亡率明显升高，差异有统计学意义($P<0.001$)；Transwell 实验检测结果显示(图 6C)，与 OE-NC 组比较，OE-PCK1 组 SJG-1 细胞侵袭能力明显减少，差异有统计学意义($P<0.001$)；Western blot 分析结果显示(图 6D)，与 OE-NC 组比较，OE-PCK1 组 N-cadherin 的表达水平显著减少，E-cadherin 水平明显升高，差异有统计学意义($P<0.001$)。见表 8、图 6。

表 8　OE-NC 组和 OE-PCK1 组 OSCC 细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化比较

Table 8　Comparison of proliferation, apoptosis, invasion, and epithelial mesenchymal transition of OSCC cells between OE-NC group and OE-PCK1 group

($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	增殖率(%)	凋亡率(%)	侵袭数量(个)	相对蛋白表达	
				N-cadherin	E-cadherin
OE-NC 组	107.12±10.11	8.93±1.41	129.68±19.45	1.95±0.63	0.64±0.11
OE-PCK1 组	79.73±12.15	46.67±7.24	42.74±8.64	0.61±0.13	2.03±0.72
t 值	5.479	16.180	12.918	6.587	6.035
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

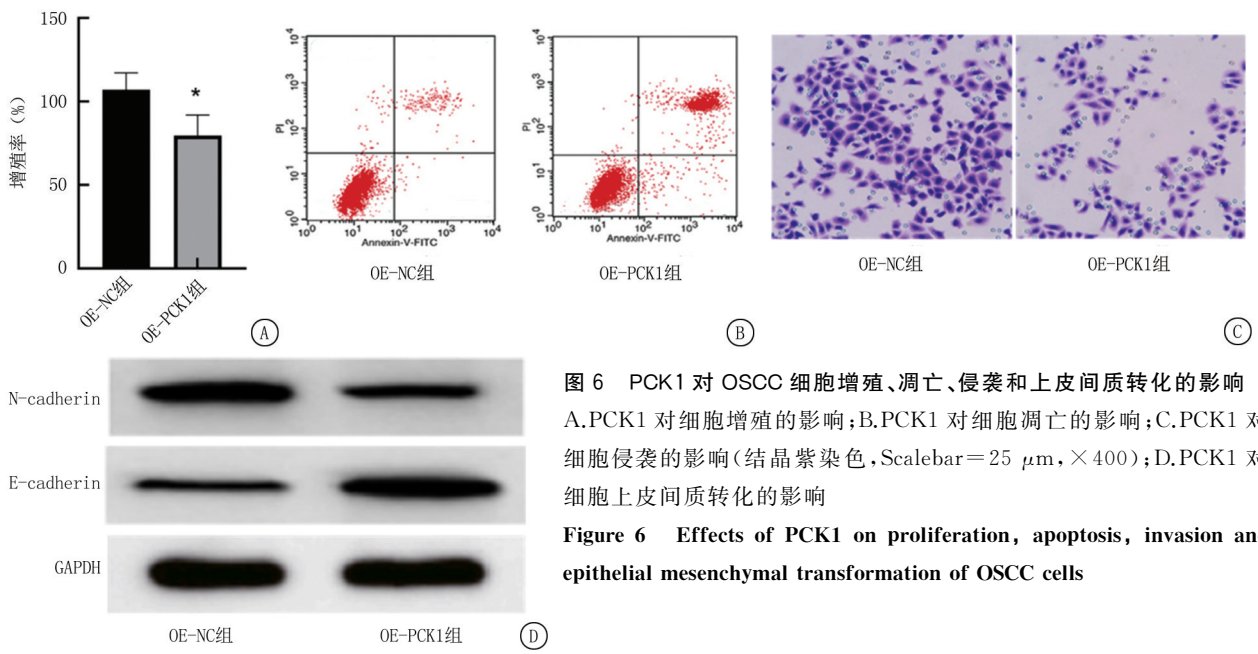


图 6　PCK1 对 OSCC 细胞增殖、凋亡、侵袭和上皮间质转化的影响

A.PCK1 对细胞增殖的影响；B.PCK1 对细胞凋亡的影响；C.PCK1 对细胞侵袭的影响(结晶紫染色，Scalebar=25 μm，×400)；D.PCK1 对细胞上皮间质转化的影响

Figure 6　Effects of PCK1 on proliferation, apoptosis, invasion and epithelial mesenchymal transformation of OSCC cells

2.8 circ_0086414 通过海绵吸收 miR-498 调节 PCK1 的表达 qRT-PCR 检测检测结果显示，与 miR-498NC + pcDNA 组比较，miR-498NC + pcDNAcirc_0086414 组 PCK1 的相对表达量明显升高，miR-498mimic + pcDNA 组 PCK1 的相对表达量明显降低（$P<0.001$）；与 miR-498mimic + pcDNA 组比较，miR-498mimic + pcDNAcirc_0086414 组的 PCK1 的相对表达量明显升高，差异有统计学意义（$P<0.001$）。见表 9。

表 9 circ_0086414 通过海绵吸收 miR-498 调空 PCK1 的表达

Table 9 circ 0086414 regulating PCK1 expression by sponge absorption of miR-498

（$n=10, \bar{x}\pm s$）

组别	PCK1 的相对表达量
miR-498 NC+pcDNA 组	1.03±0.12
miR-498 NC+pcDNA circ_0086414 组	2.04±0.56*
miR-498 mimic+pcDNA 组	0.49±0.07*#
miR-498 mimic+pcDNA circ_0086414 组	0.98±0.11*
F 值	49.090
P 值	<0.001

* P 值<0.05 与 miR-498 NC+pcDNA 组比较 # P 值<0.05 与 miR-498 NC+pcDNAcirc_0086414 组比较（SNK-q 检验）

3 讨 论

OSCC 是指发生在口腔的恶性肿瘤，主要发生在口腔鳞状细胞中[9]。癌细胞可发生在牙龈、硬腭、舌、颊黏膜、唇等器官[10]。据组织学资料显示，它属于头颈部最恶性、危害最大的肿瘤，具有周围组织浸润性强、易发生颈淋巴结转移的特点，患者预后普遍较差，5 年生存率约为 50%左右[11]，给患者的生活质量与社会医疗造成了极大的负担。OSCC 是病死率较高的一种恶性肿瘤，经过传统的手术治疗后，严重影响了患者的言语和吞咽等功能，而且辅助放疗和化疗容易引起患者的机体免疫能力降低和坏死性骨髓炎等严重并发症[12]，即便如此，OSCC 的治疗效果仍不尽人意。因此，探究 OSCC 的发生和发展调控机制，探索关键的分子生物学标记物，寻找治疗关键的靶点，对于提高 OSCC 患者的生活质量具有积极意义。

circRNA 是非编码 RNA 家族的新成员，最初被认为是 RNA 异常剪接的副产物，目前已被发现与多种人类疾病相关，如肝癌[13]和骨肉瘤[14]等。研究发现 circRNA 能够通过海绵吸附抑制 miRNA，并可以可作为肿瘤标志物[15]。近年来，CircRNA 成为肿瘤研究的热门对象，circRNA 在结直肠癌[16]、前列腺癌[17]等肿瘤进展中发挥了重要作用。在 OSCC 中，敲减 hsa_circ_0008898 表达通过调控 miR-197-5p/RHOA 轴抑制 OSCC 细胞增殖、克隆、迁移及侵袭能力，诱导细胞 G1 期阻滞，抑制裸鼠成瘤[18]。也有研究报道，Circ_0000502 可促进口腔鳞状细胞癌细胞的增殖，抑制其凋亡[19]。circ_0086414 是一种新型 circRNA，相关研究报道，cir_0086414 可能是口腔鳞状细胞癌的诊断生物标志物[20]，但其在 OSCC 中的作用和机制尚不清楚。本研究结果显示，cir_0086414 在 OSCC 组织和细胞中低表达，并能具有抑制 SJG-1 细胞增殖、侵袭和上皮间质转化，促进其凋亡的作用，表明 circ_0086414 可能成为 OSCC 诊断标志物和治疗的靶点。

circRNA 可能通过吸附 miRNA 参与调控下游 mRNA 的表达，本研究验证了 circ_0086414 和 miR-498 存在靶向关系，且 miR-498 可以降低 circ_0086414 WT 的荧光素酶活性。miR-498 在大量人类癌症中频繁异常表达，如胃癌等[21]。前期就验证了 miR-498 在 OSCC 细胞生长中的作用，miR-498 在 OSCC 组织和细胞中的表达水平显著升高，miR-498通过靶向抑制磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 1 表达促进 SCC-15 细胞增殖、迁移、侵袭，抑制细胞凋亡，可能为 OSCC 的临床诊治提供新的分子靶标[22]。本研究结果显示，miR-498 在 OSCC 组织样本和细胞系中明显升高，miR-498 的过表达可能部分逆转 circ_0086414 过表达对 OSCC 细胞增殖、侵袭和凋亡的抑制作用。上述结果提示，过表达 circ_0086414 可能通过海绵化 miR-498 来缓解 OSCC 细胞的恶性生物学特性。

miRNAs 可能通过调控其靶 mRNA 来调控肿瘤的发生[23]。无论是前期实验还是本研究都通过生物信息学软件和双荧光素酶报告基因实验鉴定 PCK1 为 miR-498 的直接靶点。PCK1 属于磷酸烯醇丙酮酸羧激酶，据报道在多种类型的癌症中表达失调[24]。另外，PCK1 作为催化糖异生不可逆反应的一个限速酶，其功能障碍与糖尿病、肥胖、胰岛素抵抗、脂肪肝和其他代谢性疾病有关[25]。前期研究报道，PCK1 上调可显著减弱 miR-498 mimics 对 SCC-15 细胞增殖、迁移和侵袭能力的增强作用及对细胞凋亡的抑制作用。本研究结果表明，过表达 PCK1 可以抑制 SJG-1 细胞增殖、侵袭和上皮间质转化，促进其凋亡的作用。进一步支持了 circ_0086414 通过 miR-498/PCK1 轴抑制口腔鳞状细胞癌生物学行为的作用。

综上所述，circ_0086414 在 OSCC 细胞和组织中的表达下调，过表达 circ_0086414 抑制 OSCC 细

胞的恶性行为。通过调控 miR-498/PCK1 轴刺激细胞凋亡，为探索 OSCC 诊断和治疗的生物标志物提供有意义的实验依据，为 OSCC 的治疗提供新的诊疗思路。

[参考文献]

[1] 王安训.表观遗传与口腔鳞状细胞癌[J].口腔疾病防治，2020，28(10)：613－622.

[2] 齐元莉，闫红娟，祖木热提古丽·阿不来提，等.口腔鳞状细胞癌中 CASZ1 的表达及临床意义[J].口腔医学研究，2022，38(1)：30－33.

[3] Zheng K，Lan T，Li GP，et al. Evaluated expression of CELSR3 in oral squamous cell carcinoma is associated with perineural invasion and poor prognosis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol，2022，133(5)：564－573.

[4] 雷可昕，白贺天，杨淞月，等.环状 RNA 与口腔鳞状细胞癌研究进展[J].华西口腔医学杂志，2020，38(4)：425－430.

[5] Yang M. CircKRT1 drives tumor progression and immune evasion in oral squamous cell carcinoma by sponging miR-495-3p to regulate PDL1 expression[J]. Cell Boil Int，2021，45(7)：1423－1435.

[6] Liu J，Jiang X，Zou A，et al. circIGHG-induced epithelial-to-mesenchymal transition promotes oral squamous cell carcinoma progression via miR-142-5p/IGF2BP3 Signaling[J]. Can Res，2021，81(2)：344－355.

[7] 李立恒，王蕊，王芹，等. miR-498 靶向磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 1对口腔鳞状细胞癌细胞生长的影响[J].实用医学杂志，2022，38(11)：1339－1345.

[8] 李琳.Hsa_circ_0086414 在口腔鳞状细胞癌中的差异表达及临床意义[D].沈阳：中国医科大学，2020.

[9] Oliveira SL，Martin SL，Oliveira DL，et al. SET protein modulates H4 histone methylation status and regulates miR-137 level in oral squamous cell carcinoma[J]. Epigenomics，2020，12(6)：475－485.

[10] Masaoka T，Shinozuka K，Ohara K，et al. Bioinformatics analysis of dysregulated exosomal microRNAs derived from oral squamous cell carcinoma cells[J]. J Oral Sci，2021，63(2)：174－178.

[11] Hftab C，Cjla D，Wwh B，et al. Co-upregulation of miR-31 and its host gene lncRNA MIR31HG in oral squamous cell carcinoma[J]. J Dent Sci，2022，17(2)：696－706.

[12] Nclab C，Smh D，Thw E，et al. The relation between NEAT1 expression level and survival rate in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. J Dent Sci，2022，17(1)：361－367.

[13] 曹颖，曹伟，贾延伟，等.circ 0001955 靶向 miR-1243 调控肝癌 BEL-7402 细胞增殖、凋亡及 EMT 的机制研究[J].中国免疫学杂志，2022，38(7)：795－800.

[14] 刘汉涛，赵良虎，秦宏敏.circ ANKIB1 通过 miR-217/DKK1 轴调控骨肉瘤恶性生物学行为的机制研究[J].局解手术学杂志，2022，31(11)：963－970.

[15] Wang Y，Zhang G，Li P，et al. Profiling and integrated analysis of the ERCC6-regulated circRNA-miRNA-mRNA network in lens epithelial cells[J]. Curr Eye Resh，2021，46(9)：1341－1352.

[16] 龚磊，冯雪雅，吴洪，等.环状 RNA circ0025847 通过促进 RNA 结合蛋白 QK1 表达抑制结直肠癌细胞的增殖[J].中华内分泌外科杂志，2021，15(5)：522－525.

[17] 王红梅，谢斌，陈寒超，等.circ_0001721/miR-198 对前列腺癌细胞生物学行为的影响[J].现代肿瘤医学，2023，31(14)：2575－2580.

[18] 周海霞，王璐瑶，陈帅，等.环状 RNA hsa_circ_0008898 对口腔鳞状细胞癌细胞的影响及其机制研究[J].中华口腔医学杂志，2020，55(8)：578－585.

[19] 马素伟，张娟，杨晋，等.Circ_0000502 靶向调节 miR-1231 促进口腔鳞状细胞癌 HSC-3 细胞增殖和抑制细胞凋亡的体外研究[J].口腔颌面外科杂志，2022，32(2)：93－99.

[20] Li L，Zhang ZT. Hsa_circ_0086414 might be a diagnostic biomarker of oral squamous cell carcinoma[J]. Med Sci Monit，2020，26(14)：e919383.

[21] 赵维波，孔令甲，岳宗柱，等.lncRNA CASC11 靶向调节 miR-498 对胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响[J].中国细胞生物学学报，2023，45(2)：213－222.

[22] Chen C，Wang P，Xu K，et al.Co-Culture of MSCs with miR-496 prompts epithelial-mesenchymal transformation of oral squamous cell carcinoma(OSCC)[J]. J Biomater Tissue Eng，2022，12(6)：1112－1117.

[23] Zhou Y，Li Q，Pan R，et al. Regulatory roles of three miRNAs on allergen mRNA expression in Tyrophagusputrescentiae[J]. Allergy，2022，77(2)：469－482.

[24] Wen YC，Liu CL，Yeh H L，et al. PCK1 regulates neuroendocrine differentiation in a positive feedback loop of LIF/ZBTB46 signalling in castration-resistant prostate cancer[J].Br J Cancer，2022，126(5)：778－790.

[25] Liu R，Gou D，Xiang J，et al. O-GlcNAc modified-TIP60/KAT5 is required for PCK1 deficiency-induced HCC metastasis[J].Oncogene，2021，40(50)：6707－6719.

（本文编辑：赵丽洁）