

环状RNA hsa_circ_0085576调控微小RNA-498/B细胞特异性莫洛尼鼠白血病毒整合位点1轴对口腔鳞状细胞癌细胞迁移和侵袭的影响

李立恒¹ 王蕊¹ 王晓明¹ 张智轶¹ 张璇¹ 安峰¹ 王芹¹ 张凡²

1. 河北北方学院附属第一医院口腔科 张家口 075000;

2. 河北北方学院附属第一医院病理科 张家口 075000

[摘要] 目的 探究环状RNA hsa_circ_0085576对口腔鳞状细胞癌(OSCC)细胞迁移和侵袭的影响及其分子机制。方法 使用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白印迹法检测OSCC细胞中hsa_circ_0085576、微小RNA-498(miR-498)以及B细胞特异性莫洛尼鼠白血病毒整合位点1(BMI-1)的表达水平。使用CCK-8、划痕实验、Transwell实验以及qRT-PCR、蛋白印迹法分别检测SCC-15细胞增殖活力、迁移及侵袭能力以及相关基因和蛋白的相对表达量。结果 OSCC细胞中hsa_circ_0085576与BMI-1表达上调,miR-498表达下调($P<0.05$)。下调hsa_circ_0085576表达或过表达miR-498后SCC-15细胞的增殖活性、划痕愈合率、侵袭细胞数目以及细胞周期蛋白D1、波形蛋白表达水平下调,miR-498和E-钙黏蛋白表达水平上调($P<0.05$);抑制miR-498表达可减弱下调hsa_circ_0085576表达对OSCC细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用;上调BMI-1表达可减弱过表达miR-498对OSCC细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用。结论 下调hsa_circ_0085576表达可通过激活miR-498/BMI-1轴抑制OSCC细胞增殖、迁移及侵袭。

[关键词] 环状RNA hsa_circ_0085576; 微小RNA-498; B细胞特异性莫洛尼鼠白血病毒整合位点1; 口腔鳞状细胞癌

[中图分类号] R730.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2024007



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Effects of circular RNA hsa_circ_0085576 on cell migration and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating the microRNA-498/B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 axis

Li Liheng¹, Wang Rui¹, Wang Xiaoming¹, Zhang Zhiyi¹, Zhang Xuan¹, An Feng¹, Wang Qin¹, Zhang Fan²

1. Dept. of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. Dept. of Pathology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Supported by: Hebei Province 2021 Annual Medical Science Research Project (20210802)

Correspondence: Li Liheng, Email: jugrmu@163.com

[Abstract] Objective This study aims to explore the effects of circular RNA hsa_circ_0085576 on cell migration and invasion of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and the underlying molecular mechanism. **Methods** Circular RNA hsa_circ_0085576, microRNA-498 (miR-498), and B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 (BMI-1) in the cells of OSCC were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot analyses. CCK-8, scratch test, Transwell test, qRT-PCR, and Western blot were used to detect the proliferation, migration, and invasion ability of SCC-15 cells and the expression of related genes and proteins. **Results** The expression of

hsa_circ_0085576 and BMI-1 in the cells of OSCC was upregulated, and that of miR-498 was downregulated ($P<0.05$). The proliferative activity, scratch healing rate, number of invasive cells, and expression levels of cyclinD1 and vimentin proteins of SCC-15 cells were

[收稿日期] 2023-06-15; **[修回日期]** 2023-09-26

[基金项目] 2021年度河北省医学科学研究课题计划(20210802)

[作者简介] 李立恒, 主治医师, 硕士, Email: jugrmu@163.com

[通信作者] 李立恒, 主治医师, 硕士, Email: jugrmu@163.com

downregulated, whereas the expression levels of miR-498 and E-cadherin proteins were upregulated ($P < 0.05$). Inhibition of miR-498 expression weakened the inhibitory effect of downregulating hsa_circ_0085576 on the proliferation, migration, and invasion of OSCC cells. Upregulation of BMI-1 expression attenuated the inhibitory effect of overexpressed miR-498 on the proliferation, migration, and invasion of OSCC cells. **Conclusion** Downregulation of hsa_circ_0085576 expression inhibited the proliferation, migration, and invasion of OSCC cells by activating the miR-498/BMI-1 axis.

[Key words] circular RNA hsa_circ_0085576; microRNA-498; B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1; oral squamous cell carcinoma

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是头颈部最常见的肿瘤之一, 5年生存率不足50%^[1]。肿瘤转移和免疫抑制是OSCC预后不良的主要原因^[2]。目前OSCC进展的分子机制仍不完全清楚。环状RNA (circular RNA, circRNA) 在癌症 (包括OSCC) 进程中起着至关重要的作用^[3-4]。腺苷二磷酸核糖基化因子鸟苷酸激酶1 (adenosine diphosphate ribosylation factor guanylate kinase 1, ASAP1) 在多种肿瘤中表达上调, 已被证明是多种肿瘤的恶性指标^[5-7]。研究^[8]发现: 在OSCC中, ASAP1表达上调, 介导癌细胞的侵袭性表型, 且ASAP1 mRNA较高的表达水平与较短的无进展生存趋势呈正相关。hsa_circ_0085576是宿主基因ASAP1经剪接环化而成的circRNA。据报道^[9]: hsa_circ_0085576在肾透明细胞癌中表达上调, 沉默其表达可靶向上调微小RNA (microRNA, miR)-498, 抑制肿瘤细胞的生长和转移。miR-498可以作为抑癌因子发挥作用^[10-11]。然而, hsa_circ_0085576和miR-498在OSCC中的表达及生物学功能仍不清楚。B细胞特异性莫洛尼鼠白血病病毒整合位点1 (B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1, BMI-1) 是一种表观遗传蛋白, 是正常干细胞自我更新和维持癌症干细胞功能所必需的。研究^[12]发现: BMI-1在OSCC中高表达, 且与肿瘤的生长和转移密切相关, 为OSCC的关键治疗靶点。此外, BMI-1被证实为miR-498的靶基因^[13]。基于此, 笔者推测hsa_circ_0085576、miR-498和BMI-1在OSCC中可能形成circRNA/miRNA/mRNA调控网络, 调节OSCC的进展, 因此本研究探讨hsa_circ_0085576在OSCC细胞增殖、迁移和侵袭中的作用及机制, 以期为OSCC的治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 细胞来源

正常人口腔角质形成细胞 (normal oral kerati-

nocytes, NOK)、OSCC细胞 (HSC-3、SCC-15和CAL-27), 均购自美国ATCC细胞中心, 货号依次为: YS552C、YS1061C、YS1185C和YS1716C。

1.2 主要试剂与仪器

Trizol (总RNA提取试剂)、实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒、逆转录试剂盒、Lipofectamine 2000转染试剂以及放射免疫沉淀测定 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液均购于美国Thermo Fisher Scientific公司; 细胞计数试剂 (cell counting kit-8, CCK-8) 细胞增殖检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司; hsa_circ_0085576小干扰RNA (small interfering, siRNA), 包括si-hsa_circ_0085576-1、si-hsa_circ_0085576-2、si-hsa_circ_0085576-3, miR-498模拟物和miR-498抑制物, BMI-1过表达载体质粒及其阴性对照, 以及实验中所涉及的引物均购于上海吉玛制药技术有限公司; Transwell小室购于美国Corning公司; 一抗BMI-1、细胞周期蛋白D1 (Cyclin D1)、波形蛋白 (Vimentin)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 以及甘油醛3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 均购于英国Abcam公司。细胞培养箱、核酸定量荧光计、酶标仪购于美国Thermo公司 (型号分别为BB150-2TCS、Qubit 4、MK3); 荧光定量PCR仪、凝胶成像仪购于美国Bio-Rad公司 (型号分别为CFX96、Gel Doc EZ); 显微镜购于日本OLYMPUS公司 (型号为IX71)。

1.3 研究方法

1.3.1 细胞培养、转染和分组 采用含胎牛血清的Dulbecco改良的Eagle培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 于37 °C培养箱中培养NOK、HSC-3、SCC-15和CAL-27细胞。NOK细胞为对照组, 通过检测不同OSCC细胞中的基因表达水平, 筛选合适的细胞进行后续干扰实验细胞。当细胞融合度达到80%左右时, 以Lipofectamine

2000转染试剂说明为依据对SCC-15细胞进行分组转染。首先，在SCC-15细胞中分别转染siRNA空白质粒（设为si-NC组）和hsa_circ_0085576-1、si-hsa_circ_0085576-2、si-hsa_circ_0085576-3（分别设为干扰1组、干扰2组、干扰3组）。其次，在干扰2组基础上分别转染miR-498抑制物阴性对照（干扰2+miR inhibitor组）和miR-498抑制物（干扰2+miR-498 inhibitor组）。再次，分别在SCC-15细胞中转染miR-498模拟物阴性对照（miR mimics组）和miR-498模拟物（miR-498 mimics组）。最后，在miR-498 mimics组基础上分别转染空白载

体质粒（miR-498 mimics+Ctrl组）和BMI-1过表达载体质粒（miR-498 mimics+BMI-1组）。

1.3.2 qRT-PCR检测基因表达 参照Trizol说明书分别提取NOK、HSC-3、SCC-15、CAL-27细胞以及各组转染后的SCC-15细胞中总RNA，经反转录形成cDNA进行qRT-PCR检测。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算hsa_circ_0085576、miR-498及BMI-1的mRNA相对表达量。qRT-PCR所用的引物序列见表1，其中U6为miR-498的内参对照，GAPDH为hsa_circ_0085576、BMI-1的内参对照。

表 1 qRT-PCR引物序列

Tab 1 qRT-PCR primer sequences

基因	上游引物(5'—3')	下游引物(5'—3')
hsa_circ_0085576	CTTGCAGTGAGCCATGGGA	GAGTCGTCTCTCCTGTACG
BMI-1	CTGGTTGCCCATGACAGC	CAGAAAATGAATGCGAGCCA
GAPDH	CTCTGCTCCTCTGTTCGAC	GCGCCCAATACGACCAATC
miR-498	GGTTTGAAGCCAGGCGGTTTC	CAGTGCAGGTCGGAGGTAT
U6	GTGCTCGTTCGGCAGCACATATAC	AAAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG

1.3.3 CCK-8检测细胞增殖活力 收集各组转染后细胞，以每孔 3×10^3 个细胞的密度接种于96孔细胞培养板中，待细胞贴壁生长到70%~90%时，每孔加入10 μ L CCK-8溶液，避光孵育2 h后在酶标仪中检测各孔细胞的吸光度值（以此表示细胞增殖活力）。

1.3.4 划痕实验检测细胞迁移能力 收集各组转染后细胞，以每孔 1×10^6 个细胞的密度接种于6孔细胞培养板中，培养24 h后采用移液管尖在每孔中间划直线。添加无血清的DEME培养基培养24 h。在培养划痕0 h和24 h时分别使用显微镜观察并拍照，测量划痕宽度。划痕愈合率(%) = (0 h划痕宽度 - 24 h划痕宽度) ÷ 0 h划痕宽度 × 100%。

1.3.5 Transwell实验检测细胞侵袭数量 收集各组转染后细胞，使用无血清培养基将细胞密度调整为每毫升 1×10^6 个，吸取300 μ L加入到Transwell上室（含有基质胶），下室中加入500 μ L正常培养基，培养24 h后取出小室，用棉签拭去上室中未侵袭的细胞，添加4%多聚甲醛固定后，加入1%结晶紫染色，磷酸盐缓冲液（phosphate buffered solution, PBS）冲洗后于倒置显微镜下观察并拍照，随机选择5个视野进行细胞计数。

1.3.6 蛋白印迹法（Western blot）检测相关蛋白

的表达水平 使用RIPA裂解液分别提取NOK、HSC-3、SCC-15、CAL-27细胞以及各组转染后的SCC-15细胞中的总蛋白，测定蛋白浓度后，采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）分离蛋白并转膜。5%脱脂牛奶封闭后添加一抗BMI-1、Cyclin D1、Vimentin、E-cadherin及GAPDH，低温孵育过夜，然后加入辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP）标记的二抗孵育2 h，显影，在凝胶成像仪中拍照，使用Image J软件分析条带灰度值。目的蛋白的相对表达水平=目的蛋白灰度值/GAPDH灰度值。

1.3.7 双荧光素酶报告基因检测 使用starBase数据库 (<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) 预测hsa_circ_0085576或BMI-1与miR-498的结合位点。将具有miR-498结合位点的野生型（wild type, WT）hsa_circ_0085576或BMI-1 3'-非翻译区（untranslated regions, UTR）的cDNA片段插入到荧光素酶报告载体pmirGLO中，分别命名为WT-hsa_circ_0085576和WT-BMI-1。hsa_circ_0085576和BMI-1 3'UTR的突变是通过使用基因突变试剂盒（Takara公司，日本）改变miR-498的互补结合位点来进行的，插入到荧光素酶报告载体pmirGLO中构建突变体（mutant, MUT），命名为MUT-hsa_circ_0085576和MUT-BMI-1。在24孔

板中培养SCC-15细胞(每孔 1×10^4 个细胞),并使用Lipofectamine 2000将构建的hsa_circ_0085576或BMI-1 3'-UTR报告载体与miR-498模拟物(miR-498 mimic)或阴性对照(negative control, NC)模拟物(miR-NC)共转染SCC-15细胞并孵育48 h,收获细胞后用PBS洗涤,裂解缓冲液裂解,使用双荧光素酶报告分析系统测量荧光素酶活性。

1.4 统计学处理

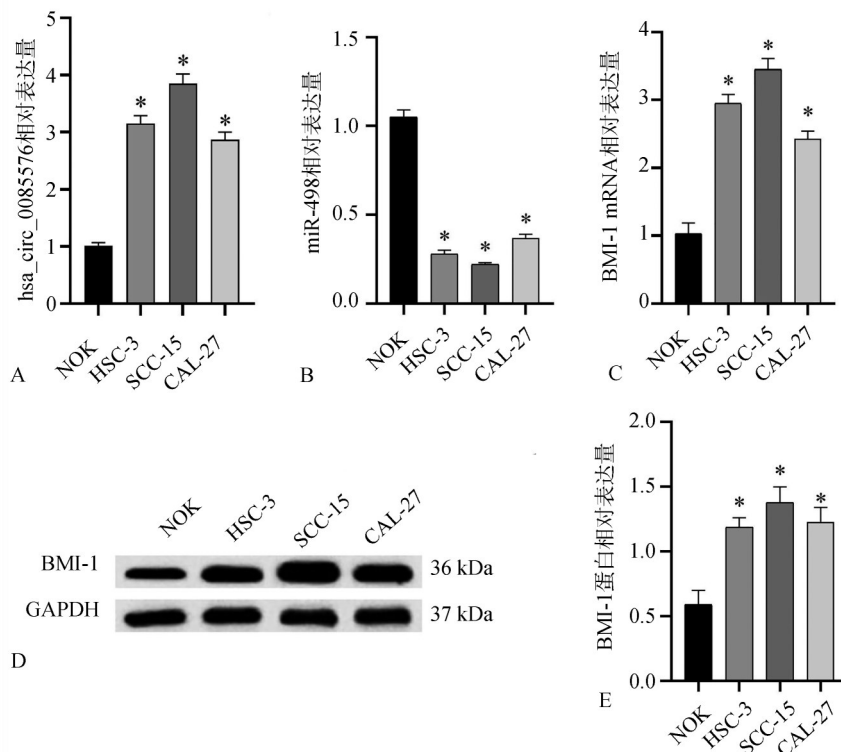
采用SPSS 25.0进行统计学分析,使用Shapiro-Wilk检验评估数据的正态分布,符合正态分布的数据使用均数 \pm 标准差表示。多组间比较采用单

因素方差分析和LSD-*t*检验,检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 hsa_circ_0085576、miR-498、BMI-1在OSCC细胞中的表达情况

图1结果表明,与NOK细胞相比,HSC-3、SCC-15和CAL-27细胞中hsa_circ_0085576与BMI-1 mRNA表达增高($P<0.05$),miR-498的表达降低($P<0.05$),且OSCC各细胞系中BMI-1的蛋白水平也高于NOK细胞($P<0.05$)。



A: hsa_circ_0085576相对表达量; B: miR-498相对表达量; C: BMI-1 mRNA相对表达量; D、E: Western blot测定BMI-1蛋白相对表达量。

*: 与NOK组相比, $P<0.05$ 。

图1 不同OSCC细胞中hsa_circ_0085576、miR-498和BMI-1表达水平

Fig 1 Expression levels of hsa_circ_0085576, miR-498 and BMI-1 in different OSCC cells

由图1可见,SCC-15细胞中3个基因表达趋势与NOK细胞差异最大,故后续选择SCC-15细胞作为研究这3个基因的OSCC细胞载体。

2.2 下调hsa_circ_0085576表达对miR-498与BMI-1表达的影响

各组miR-498与BMI-1的相对表达量见图2和表2。与si-NC组相比,干扰1、2、3组的hsa_circ_0085576($P<0.05$)和BMI-1的蛋白表达降低($P<0.05$),miR-498的表达增高($P<0.05$);其中干扰2组的干扰效率最高,故之后选择此组细胞作为后

续研究对象。

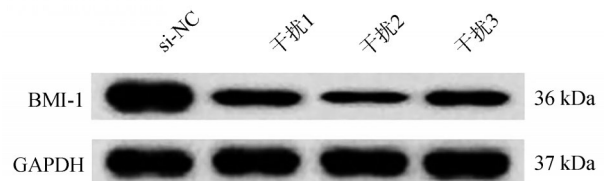


图2 下调hsa_circ_0085576表达对BMI-1蛋白表达的影响

Fig 2 Effect of down-regulated expression of hsa_circ_0085576 on expression of BMI-1 protein

表 2 下调 hsa_circ_0085576 表达对 miR-498 与 BMI-1 表达的影响

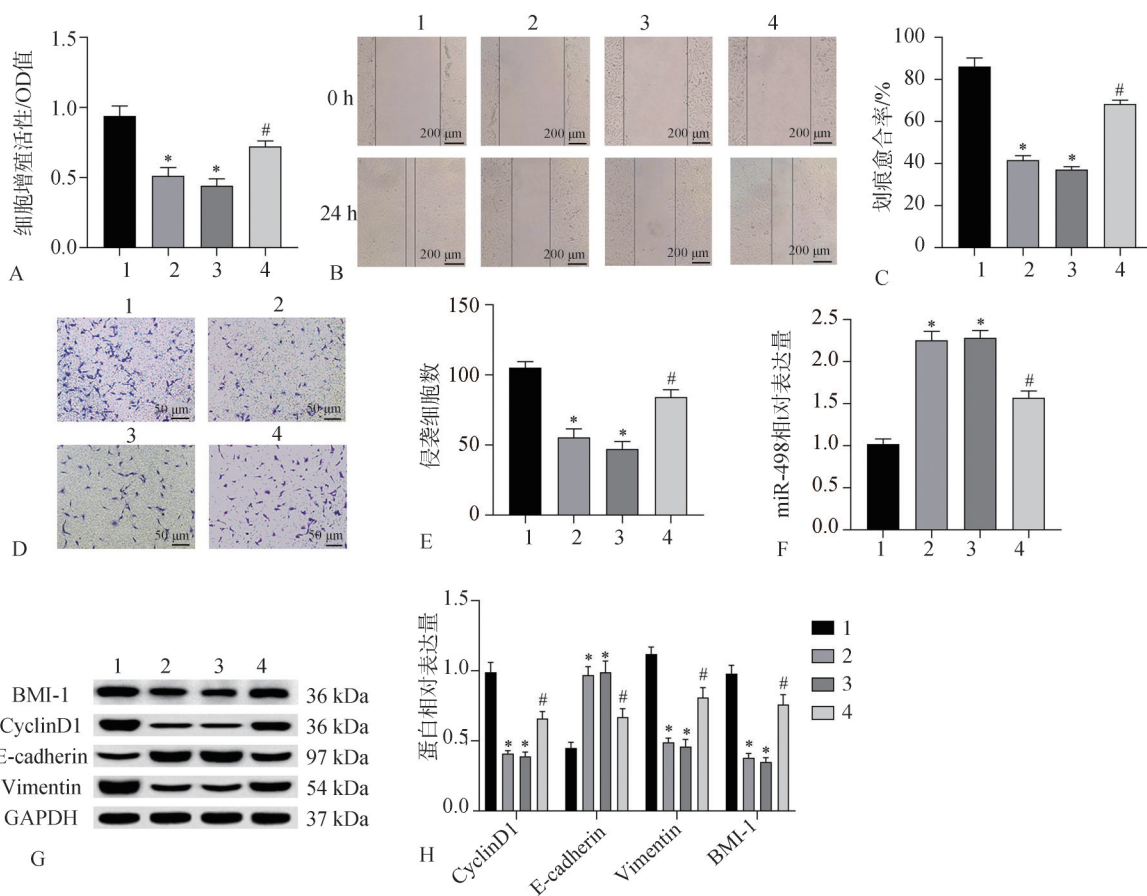
Tab 2 Effect of down-regulated expression of hsa_circ_0085576 on expression of miR-498 and BMI-1

组别	hsa_circ_0085576	miR-498	BMI-1 蛋白
si-NC	1.02±0.07	1.00±0.06	1.29±0.18
干扰 1	0.52±0.04*	1.55±0.11*	0.57±0.06*
干扰 2	0.24±0.00*	2.15±0.12*	0.46±0.04*
干扰 3	0.31±0.02*	1.96±0.14*	0.53±0.03*

注：与 si-NC 组比较，**P*<0.05。

2.3 下调 hsa_circ_0085576 和 miR-498 表达对 SCC-15 细胞增殖、迁移、侵袭和 BMI-1 的影响

如图3所示：与si-NC组相比，干扰2组SCC-15细胞的增殖活性、划痕愈合率、侵袭细胞数目以及Cyclin D1、Vimentin、BMI-1蛋白表达水平均降低，miR-498和E-cadherin蛋白表达水平增高 (*P*<0.05)；与干扰2组相比，干扰2+miR-498 inhibitor组SCC-15细胞的增殖活性、划痕愈合率、侵袭细胞数目以及Cyclin D1、Vimentin、BMI-1蛋白表达水平均增高，miR-498和E-cadherin蛋白表达水平降低 (*P*<0.05)。



A: CCK-8 检测细胞增殖活力；B、C: 划痕实验测定细胞迁移；D、E: Tranwell 实验测定细胞侵袭；F: qRT-PCR 检测 miR-498 相对表达水平；G、H: Western blot 测定 CyclinD1、Vimentin、E-cadherin 以及 BMI-1 的蛋白表达；组别：1 为 si-NC 组，2 为干扰 2 组，3 为干扰 2+miR inhibitor 组，4 为干扰 2+miR-498 inhibitor 组。*：与 si-NC 组相比，*P*<0.05；#：与干扰 2+miR inhibitor 组相比，*P*<0.05。

图 3 下调 hsa_circ_0085576 和 miR-498 表达对 SCC-15 细胞增殖、迁移、侵袭的影响

Fig 3 Effect of down-regulated expression of hsa_circ_0085576 and miR-498 on proliferation, migration and invasion of SCC-15 cells

2.4 过表达 miR-498 和 BMI-1 对 SCC-15 细胞增殖、迁移、侵袭的影响

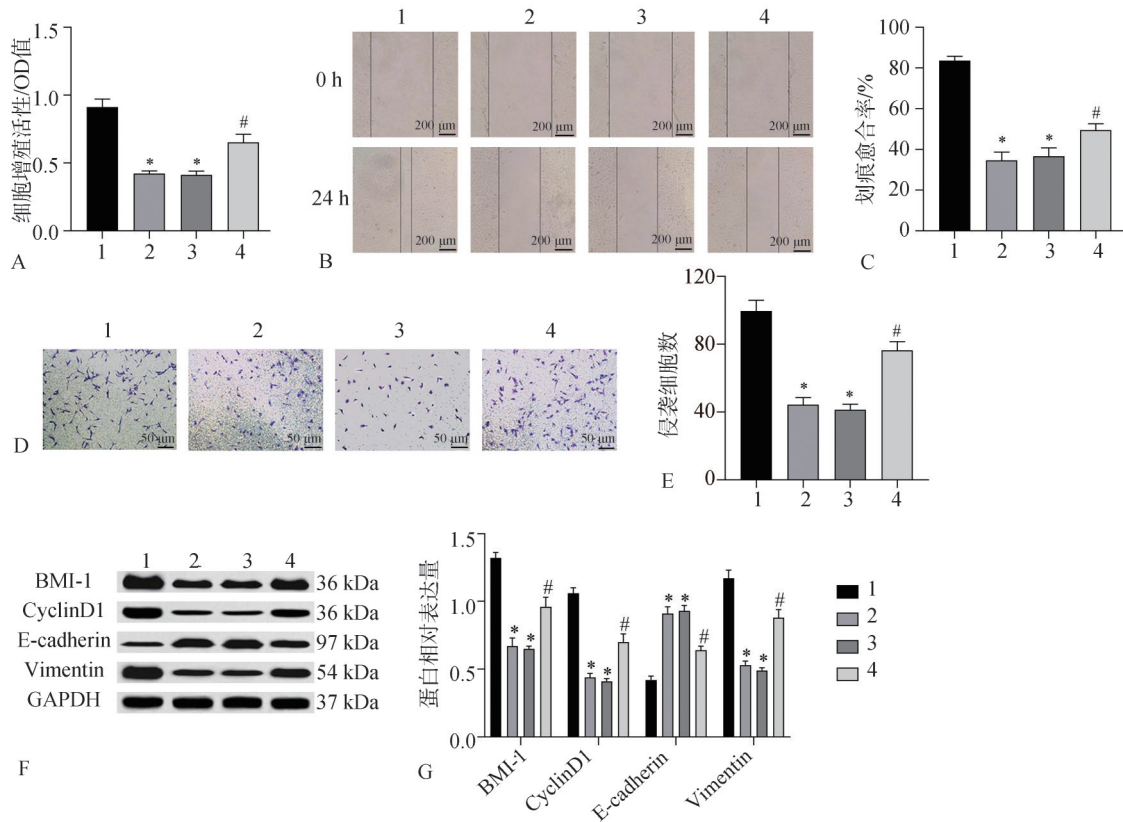
过表达miR-498和BMI-1对SCC-15细胞的影响如图4所示：与miR mimics组相比，miR-498 mimics组SCC-15细胞的增殖活力、划痕愈合率、侵袭细胞数目以及BMI-1、Cyclin D1、Vimentin蛋白表

达水平均降低，E-cadherin蛋白表达水平增高 (*P*<0.05)；与 miR-498 mimics 组相比，miR-498 mimics+BMI-1 组 SCC-15 细胞的增殖活力、划痕愈合率、侵袭细胞数目以及 BMI-1、Cyclin D1、Vimentin 蛋白表达水平均增高，E-cadherin 蛋白表达水平降低 (*P*<0.05)。

2.5 hsa_circ_0085576、miR-498 和 BMI-1 的靶向关系验证

使用starBase数据库预测了hsa_circ_0085576与miR-498的结合位点,结果见图5A。双荧光素酶报告基因测定以验证hsa_circ_0085576与miR-498的相互作用,结果显示:与miR-NC和WT-

hsa_circ_0085576共转染组相比,miR-498 mimic和WT-hsa_circ_0085576共转染组细胞的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$);然而,与miR-NC和MUT-hsa_circ_0085576共转染组相比,miR-498 mimic和MUT-hsa_circ_0085576共转染组细胞的荧光素酶活性无显著变化($P>0.05$),结果见图5B。



A: CCK-8检测细胞增殖活力; B、C: 划痕实验测定细胞迁移; D、E: Tranwell实验测定细胞侵袭; F、G: Western blot测定BMI-1、CyclinD1、Vimentin以及E-cadherin的蛋白表达; 组别: 1为miR mimics组, 2为miR-498 mimics组, 3为miR-498 mimics+Ctrl组, 4为miR-498 mimics+BMI-1组。与miR mimics组相比, $*P<0.05$; 与miR-498 mimics+Ctrl组相比, $#P<0.05$ 。

图4 过表达miR-498和BMI-1对SCC-15细胞增殖、迁移、侵袭的影响

Fig 4 Effects of overexpression of miR-498 and BMI-1 on proliferation, migration and invasion of SCC-15 cells

使用StarBase数据库预测miR-498在BMI-1上的潜在结合位点,结果见图5C。双荧光素酶测定miR-498与BMI-1的相互作用,结果显示:与miR-NC和WT-BMI-1共转染组相比,miR-498 mimic和WT-BMI-1共转染组细胞的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$);然而与miR-NC和MUT-BMI-1共转染组相比,miR-498 mimic和MUT-BMI-1共转染组细胞的荧光素酶活性无显著变化($P>0.05$),见图5D。

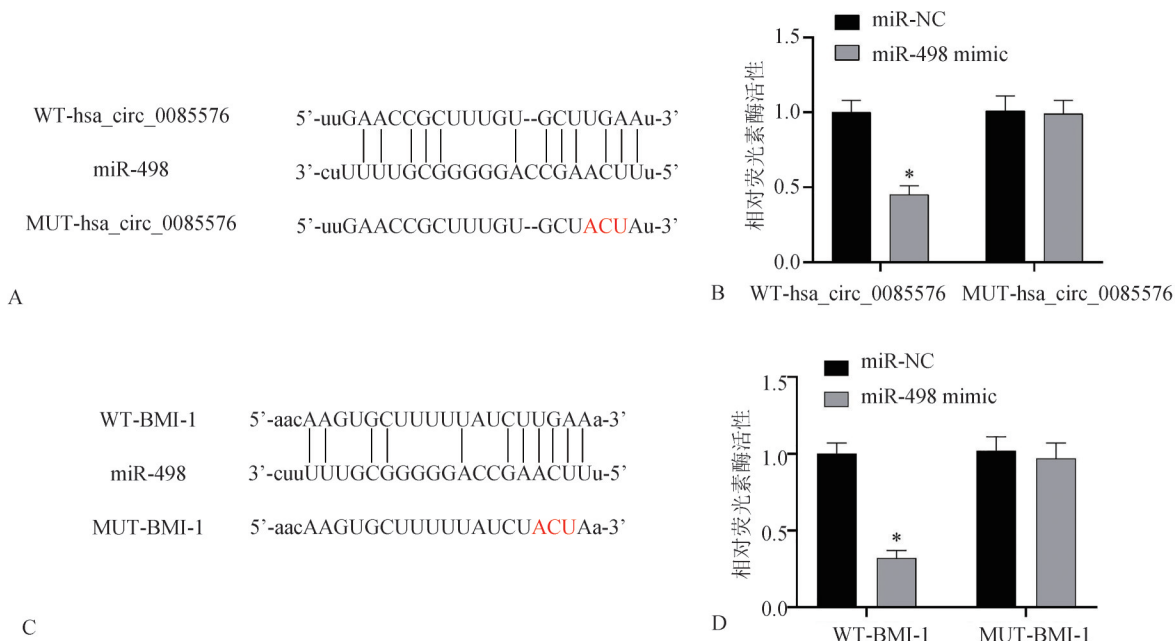
3 讨论

失调的circRNA可以作为癌症进展中的促癌或

抗癌因子。circRNA通过“海绵”miRNA发挥转录因子的作用,被认为是竞争性内源性RNA^[14-15]。已有研究^[9]证实:hsa_circ_0085576可作为竞争性内源性RNA与miR-498直接相互作用,减弱其对靶基因的抑制作用,进而影响肾细胞癌细胞的增殖、迁移、侵袭过程。miR-498在多数肿瘤中充当抑癌基因,如miR-498在食管癌中下调,其过表达可通过抑制巨噬细胞自噬和M2样极化从而抑制食管癌进展^[10];上调miR-498表达能够抑制胃癌细胞的增殖、迁移和EMT^[13]。本研究发现:miR-498在OSCC细胞中呈低表达,而过表达miR-498和沉默hsa_circ_0085576均可上调miR-498和E-cadherin表

达，降低SCC-15细胞的增殖、迁移和侵袭能力以及Cyclin D1、Vimentin表达，该结果表明miR-498是OSCC中的抑癌基因。为了进一步验证hsa_circ_0085576的作用机制，本研究采用生物信息学网站对hsa_circ_0085576的靶miRNA进行分析，发现miR-498序列存在与hsa_circ_0085576互补的结合位点，双荧光素酶结果证实hsa_circ_0085576可作

为miR-498的“海绵”，并采用miR-498 inhibitor转染以下调miR-498表达，结果发现抑制miR-498表达可在一定程度上减弱hsa_circ_0085576沉默对SCC-15细胞恶性行为的抑制作用。这一结果提示：miR-498介导hsa_circ_0085576对OSCC细胞恶性行为具有调控作用。



A: 预测的 hsa_circ_0085576 与 miR-498 的结合位点，红色表示突变的结合位点；B: hsa_circ_0085576 与 miR-498 的双荧光素酶检测结果；C: 预测的 miR-498 与 BMI-1 的结合位点，红色表示突变的结合位点；D: miR-498 与 BMI-1 的双荧光素酶检测结果。与 miR-NC 组相比，* $P < 0.05$ 。

图 5 hsa_circ_0085576、miR-498 和 BMI-1 的靶向关系

Fig 5 Targeting relationship between hsa_circ_0085576, miR-498, and BMI-1

BMI-1和miRNA之间的相互作用已经被证实，二者可以共同影响人类癌症的生物学过程，如miR-218可直接与BMI-1相互作用，抑制BMI-1表达，进而抑制肝癌细胞的生长过程^[16]。有研究^[13,17]证实，BMI-1是miR-498的直接靶基因，二者呈负相关。在本研究中，BMI-1在OSCC细胞中呈高表达，与miR-498表达趋势相反。外源添加miR-498 mimics可降低SCC-15细胞中BMI-1的表达，抑制Cyclin D1、Vimentin表达以及细胞的增殖、迁移和侵袭能力，并促进E-cadherin表达；双荧光素酶结果证实BMI-1为miR-498的靶基因，这与既往的研究结果一致，表明miR-498可靶向负调控BMI-1。此外，在过表达miR-498的基础上上调BMI-1可减弱miR-498过表达对OSCC细胞恶性行为的抑制作用。这一结果提示：过表达miR-498可通过靶向下调BMI-1进而抑制SCC-15细胞增殖、迁移和侵袭。

综上所述，沉默hsa_circ_0085576可通过上调miR-498抑制BMI-1表达，从而抑制OSCC细胞增殖、迁移和侵袭，进而抑制OSCC的恶性进展。本研究为OSCC的靶向治疗提供了思路。在未来的研究中需扩大样本量，进一步分析hsa_circ_0085576的临床意义并结合体内动物实验及多个OSCC细胞系中对本结论进行多方面验证。此外，本研究仅选择BMI-1作为miR-498的靶基因进行了探究，并未对其他靶基因进行验证，后续将针对以上不足进行更深入的研究。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

4 参考文献

[1] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer[J]. *Oral Oncol*, 2009, 45 (4/5): 309-316.

- [2] Thakur R, Thakar A, Malhotra RK, et al. Tumor-host interface in oral squamous cell carcinoma: impact on nodal metastasis and prognosis[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2021, 278(12): 5029-5039.
- [3] 宗曾艳, 孔凡虹, 王萌萌, 等. 环状RNA在恶性肿瘤发生发展和诊疗中的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(1): 98-103.
- Zong ZY, Kong FH, Wang MM, et al. Research progress of circular RNA in carcinogenesis, development, diagnosis and treatment of malignant tumors [J]. *Int J Lab Med*, 2020, 41(1): 98-103.
- [4] Liu JP, Jiang X, Zou AL, et al. circIGHG-induced epithelial-to-mesenchymal transition promotes oral squamous cell carcinoma progression via miR-142-5p/IGF₂BP₃ signaling[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(2): 344-355.
- [5] Müller T, Stein U, Poletti A, et al. ASAP1 promotes tumor cell motility and invasiveness, stimulates metastasis formation *in vivo*, and correlates with poor survival in colorectal cancer patients[J]. *Oncogene*, 2010, 29(16): 2393-2403.
- [6] Luo Q, Zhang SY, Zhang DH, et al. Expression of ASAP1 and FAK in gastric cancer and its clinicopathological significance[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(1): 974-980.
- [7] He JC, McLaughlin RP, van der Beek L, et al. Integrative analysis of genomic amplification-dependent expression and loss-of-function screen identifies ASAP1 as a driver gene in triple-negative breast cancer progression[J]. *Oncogene*, 2020, 39(20): 4118-4131.
- [8] Li MH, Tian LL, Yao HC, et al. ASAP1 mediates the invasive phenotype of human laryngeal squamous cell carcinoma to affect survival prognosis[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(6): 2676-2682.
- [9] Liu GH, Zhou JM, Piao YL, et al. Hsa_circ_0085576 promotes clear cell renal cell carcinoma tumorigenesis and metastasis through the miR-498/YAP1 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(12): 11530-11549.
- [10] Li DZ, Yan M, Sun FF, et al. miR-498 inhibits autophagy and M2-like polarization of tumor-associated macrophages in esophageal cancer via MDM2/ATF₃[J]. *Epigenomics*, 2021, 13(13): 1013-1030.
- [11] Chen DP, Li YS, Wang YK, et al. LncRNA HOTAIRM1 knockdown inhibits cell glycolysis metabolism and tumor progression by miR-498/ABCE1 axis in non-small cell lung cancer[J]. *Genes Genomics*, 2021, 43(2): 183-194.
- [12] Kalish JM, Tang XH, Scognamiglio T, et al. Doxycycline-induced exogenous Bmi-1 expression enhances tumor formation in a murine model of oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(5): 400-411.
- [13] You D, Wang DW, Liu PJ, et al. MicroRNA-498 inhibits the proliferation, migration and invasion of gastric cancer through targeting BMI-1 and suppressing AKT pathway[J]. *Hum Cell*, 2020, 33(2): 366-376.
- [14] Deng GX, Mou TY, He JY, et al. Circular RNA circ-RHOBTB3 Acts as a sponge for miR-654-3p inhibiting gastric cancer growth[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 1.
- [15] Peng QS, Cheng YN, Zhang WB, et al. circRNA_0000140 suppresses oral squamous cell carcinoma growth and metastasis by targeting miR-31 to inhibit Hippo signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 112.
- [16] Wu J, Jiang ZM, Xie Y, et al. miR-218 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of proto-oncogene Bmi-1[J]. *J BUON*, 2018, 23(3): 604-610.
- [17] Rong X, Gao W, Yang XM, et al. Downregulation of hsa_circ_0007534 restricts the proliferation and invasion of cervical cancer through regulating miR-498/BMI-1 signaling[J]. *Life Sci*, 2019, 235: 116785.

(本文编辑 吴爱华)