

circNEIL3靶向miR-218-5p对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭的影响

刘月强* 邢红艳 冯江洁

(忻州市第二人民医院, 口腔科, 忻州 034100)

摘要 该文旨在探讨circNEIL3对口腔鳞癌细胞生物学行为的影响及其可能的作用机制。采用qRT-PCR法检测口腔鳞癌组织、癌旁组织、人口腔鳞癌细胞(CAL-27、SCC-25、SCC-9、HSC-3)以及正常口腔角质细胞HOK中circNEIL3、miR-218-5p的表达量;以CAL-27细胞为研究对象, si-circNEIL3、miR-218-5p mimics、si-NC、miR-NC分别转染至CAL-27细胞, si-circNEIL3和anti-miR-NC、si-circNEIL3和anti-miR-218-5p分别共转染至CAL-27细胞;MTT法检测CAL-27细胞增殖情况;流式细胞术检测CAL-27细胞凋亡情况;Transwell检测CAL-27细胞侵袭和迁移情况。双荧光素酶报告实验检测circNEIL3与miR-218-5p的靶向关系;Western blot检测Bax、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3蛋白表达量。与癌旁组织相比,口腔鳞癌组织中circNEIL3的表达量升高($P<0.01$), miR-218-5p的表达量降低($P<0.01$);与HOK细胞相比,人口腔鳞癌细胞(CAL-27、SCC-25、SCC-9、HSC-3)中circNEIL3的表达量升高($P<0.05$), miR-218-5p的表达量降低($P<0.05$)。分别与转染si-NC或miR-NC相比,转染si-circNEIL3或转染miR-218-5p mimics增加细胞增殖抑制率、凋亡率和Bax、caspase-3、cleaved-caspase-3蛋白表达量,下调Bcl-2蛋白表达量,减少迁移、侵袭细胞数($P<0.01$);circNEIL3可负向调控miR-218-5p的表达;与共转染si-circNEIL3和anti-miR-NC相比,共转染si-circNEIL3和anti-miR-218-5p后细胞增殖抑制率、细胞凋亡率和Bax、caspase-3、cleaved-caspase-3蛋白水平降低($P<0.01$),迁移及侵袭细胞数增多($P<0.01$),Bcl-2蛋白水平升高($P<0.01$)。circNEIL3可通过靶向负调控miR-218-5p抑制口腔鳞癌细胞增殖、迁移及侵袭,并促进细胞凋亡。

关键词 口腔鳞癌; circNEIL3; miR-218-5p; 细胞增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

Effects of circNEIL3 Targeting miR-218-5p on Proliferation, Apoptosis, Migration and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells

LIU Yueqiang*, XING Hongyan, FENG Jiangjie

(Department of Stomatology, Xinzhou Second People's Hospital, Xinzhou 034100, China)

Abstract This study aimed to investigate the effect of circNEIL3 targeting miR-218-5p on the biological behavior of oral squamous cell carcinoma cells. qRT-PCR was used to detect the expression of circNEIL3 and miR-218-5p in oral squamous cell carcinoma tissue, adjacent tissue and human oral squamous cell carcinoma cell (CAL-27, SCC-25, SCC-9, HSC-3) and normal oral keratinocyte HOK. Taking CAL-27 cells as the research object, si-circNEIL3, miR-218-5p mimics, si-NC, miR-NC were transfected into CAL-27 cells, si-circNEIL3 and anti-miR-NC, si-circNEIL3 and anti-miR-218-5p were co-transfected into CAL-27 cells. CAL-27 cell proliferation was detected by MTT assay; CAL-27 cell apoptosis was detected by flow cytometry; the invasion and migration of

收稿日期: 2023-01-12 接受日期: 2023-04-03

*通讯作者: Tel: 13546768287, E-mail: izwrqv@163.com

Received: January 12, 2023

Accepted: April 3, 2023

*Corresponding author. Tel: +86-13546768287, E-mail: izwrqv@163.com

CAL-27 cells were detected by Transwell. Dual-luciferase reporter assay was used to detect the targeting relationship between circNEIL3 and miR-218-5p. Western blot was used to detect the expression of Bax, Bcl-2, caspase-3, and cleaved-caspase-3 protein. Compared with adjacent tissues, the expression of circNEIL3 in oral squamous cell carcinoma tissues was increased ($P<0.01$), while the expression of miR-218-5p was decreased ($P<0.01$); compared with HOK cells, the expression of circNEIL3 in human oral squamous cell carcinoma cells (CAL-27, SCC-25, SCC-9, HSC-3) was increased ($P<0.05$), and the expression of miR-218-5p was decreased ($P<0.05$). Compared with transfection of si-NC or miR-NC, transfection of si-circNEIL3 or miR-218-5p mimics increased cell proliferation inhibition rate, apoptosis rate, and Bax, caspase-3, and cleaved-caspase-3 protein levels ($P<0.01$), decreased Bcl-2 protein level ($P<0.01$), and reduced the number of migrating and invasive cells ($P<0.01$). circNEIL3 could negatively regulate the expression of miR-218-5p. Compared with co-transfection of si-circNEIL3 and anti-miR-NC, after co-transfection with si-circNEIL3 and anti-miR-218-5p, the cell proliferation inhibition rate, apoptosis rate and the protein levels of Bax, caspase-3, and cleaved-caspase-3 were reduced ($P<0.01$), while the number of migrating and invasive cells was increased ($P<0.01$), and the protein level of Bcl-2 was increased ($P<0.01$). circNEIL3 can inhibit the proliferation, migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells and promote cell apoptosis by targeting and negatively regulating miR-218-5p.

Keywords oral squamous cell carcinoma; circNEIL3; miR-218-5p; cell proliferation; apoptosis; migration; invasion

口腔鳞状细胞癌(简称口腔鳞癌)是一种常见的恶性肿瘤,通常起源于黏膜,好发于舌头和口腔,具有复发率高、转移率高、预后差的特点。多数患者确诊时已处于临床治疗晚期,随着医学治疗技术的进步,口腔鳞癌的治疗效果有所改善,但患者预后仍然较差,患者5年生存率低于60%^[1-2]。因此,全面了解口腔鳞癌生长和转移的分子机制,寻找新的治疗靶点具有重要意义。近年来,在口腔鳞癌中发现了circRNA的异常表达,并且circRNA已被证明在口腔鳞癌的进展中发挥作用。例如, circ_0005320在口腔鳞癌组织和细胞中表达水平升高,敲低其表达可抑制细胞增殖、迁移、侵袭和体内肿瘤生长,促进细胞凋亡^[3]; circLPAR3的表达在口腔鳞癌组织和细胞中升高,沉默其表达可降低口腔鳞癌细胞的增殖活力、迁移和侵袭能力,同时增强口腔鳞癌细胞凋亡能力^[4]。circNEIL3是一种由Nei内切核酸酶VIII样蛋白3(Nei endonuclease VIII like protein 3, NEIL3)基因的剪切环化产生的致癌circRNA,据报道, circNEIL3在肝癌细胞中表达水平升高^[5]。circNEIL3在辐射诱导的肺腺癌细胞中显著下调,其下调显著增强了放疗的疗效^[6]。circNEIL3在胶质瘤发生和恶性进展方面发挥着不可忽视的作用^[7]。以上研究表明, circNEIL3在多种癌症中发挥促癌作用。在前期研究中,笔者发现circNEIL3在口腔鳞癌组织中的表达水平显著高于癌

旁组织,但circNEIL3与口腔鳞癌相关性研究尚未见报道。circNEIL3可作为海绵竞争性结合miRNA,从而影响miRNA对靶基因的作用,参与癌症进展。生物信息学预测发现, circNEIL3与miR-218-5p序列存在互补的结合位点, miR-218-5p是circNEIL3的潜在靶点。据报道, miR-218-5p在宫颈癌、肺腺癌等癌症进展中发挥抑制作用^[8-9]。miR-218-5p在口腔鳞癌细胞中的表达水平降低^[10]。但circNEIL3/miR-218-5p分子轴在口腔鳞癌发生及发展过程中的作用机制尚未明确。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

2020年1月至2020年5月,收集本院收治的经组织病理学检查确诊的43例口腔鳞癌患者的癌组织及其癌旁组织,置于-80℃超低温冰箱内保存。其中男23例,女20例;年龄49~68岁,≤60岁的21例,>60岁的22例,平均年龄为(53.65±5.58)岁;临床分期为I~II的有24例,III~IV的有19例;有淋巴结转移的11例,无淋巴结转移的32例。本研究所有患者均签署了知情同意书,研究方案经忻州市第二人民医院医学伦理委员会批准(批准号:L20210621)。

人口腔鳞癌细胞[CAL-27(货号:CC-Y1566)、SCC-25(货号:CC-Y1775)、SCC-9(货号:CC-Y1639)和HSC-3(货号:CC-Y1753)]购自上海酶研生物科

技术有限公司; 正常口腔角质细胞 HOK(货号: YB-ATCC-8397)购自上海钰博生物科技有限公司; 反转录、荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; TRIzol 试剂、Lipofectamine™ 3000 试剂购自美国 Invitrogen 公司; si-circNEIL3、si-NC、pcDNA-circNEIL3、pcDNA-NC、anti-miR-218-5p、anti-miR-NC、miR-218-5p mimics、miR-NC 购自广州锐博生物科技有限公司; MTT 试剂、细胞凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司; WT-circNEIL3、MUT-circNEIL3 荧光素酶报告基因载体及其活性检测试剂盒购自美国 Promega 公司; 山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 CST 公司; 兔抗 Bax、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3 抗体和 GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将 CAL-27 细胞接种至 6 孔板, 待细胞生长至 80% 融合度时进行转染, 采用脂质体转染法分别转染 si-circNEIL3、si-NC、miR-218-5p mimics、miR-NC 至 CAL-27 细胞, 记为 si-circNEIL3 组、si-NC 组、miR-218-5p 组、miR-NC 组。采用脂质体转染法分别共转染 si-circNEIL3 和 anti-miR-NC、si-circNEIL3 和 anti-miR-218-5p 至 CAL-27 细胞, 记为 si-circNEIL3+anti-miR-NC 组、si-circNEIL3+anti-miR-218-5p 组。

1.2.2 qRT-PCR 测定 circNEIL3、miR-218-5p 表达情况 向癌旁组织、口腔鳞癌组织、人口腔鳞癌细胞 (CAL-27、SCC-25、SCC-9 和 HSC-3) 和正常口腔角质细胞 HOK 以及各组 CAL-27 细胞中加 1 mL TRIzol 试剂提取总 RNA。合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 扩增, 应用罗氏 LightCycler480 PCR 仪测定 circNEIL3 和 miR-218-5p 的相对表达量。circNEIL3 引物序列: F 5'-CAA GCG TCC TAA TTG TGG TCA-3', R 5'-CCC TGC TAG ATG TCC AAC TGA TT-3'; GAPDH 引物序列: F 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3', R 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'; miR-218-5p 引物序列: F 5'-GCC GAG TTG TGC TTG ATC TAA CC-3', R 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA-3'; U6 引物序列: F 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT-3', R 5'-ACG CTT CAC GAA TTT GCG TGT-3'。

1.2.3 MTT 测定 CAL-27 细胞增殖情况 接种 1.2.1 中的各组 CAL-27 细胞至 96 孔板, 每孔加 20 μ L MTT

溶液, 4 h 后, 去除培养基, 每孔加入 150 μ L DMSO, 用酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度 (D) 值。根据 D 值计算增殖抑制率, 抑制率 = $(1 - D_{\text{实验组}} / D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞术测定 CAL-27 细胞凋亡情况 用胰酶消化 1.2.1 中的各组 CAL-27 细胞, 取细胞悬液, 3 000 r/min 离心 5 min, 按照凋亡检测试剂盒说明处理细胞, 上流式细胞仪检测凋亡率。

1.2.5 Transwell 实验测定 CAL-27 细胞迁移、侵袭情况 迁移实验: 将 100 μ L 1.2.1 中的各组 CAL-27 细胞悬液接种至 Transwell 的上室, 取 600 μ L 含有血清的培养液加至下室; 随后, 将细胞在恒温培养箱中培养 24 h, 用棉签去除膜上表面残留的细胞; 接下来, 将细胞在 4% 多聚甲醛中固定 20 min, 室温风干, 用结晶紫溶液染色 10 min; 然后, 在显微镜下计数细胞。侵袭实验: 将细胞接种至包被有 Matrigel 的上室, 后续实验步骤同迁移实验。

1.2.6 双荧光素酶报告实验证实 circNEIL3 与 miR-218-5p 的靶向关系 用 starBase 数据库 (<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) 预测 circNEIL3 与 miR-218-5p 的互补结合位点。将含有 miR-218-5p 的结合位点的 circNEIL3 序列克隆至 pGL3 质粒, 构建野生型 circNEIL3 载体 WT-circNEIL3, 用点突变技术构建突变型载体 MUT-circNEIL3, 将 miR-NC 和 WT-circNEIL3、miR-NC 和 MUT-circNEIL3、miR-218-5p mimics 和 WT-circNEIL3、miR-218-5p mimics 和 MUT-circNEIL3 共转染至 CAL-27 细胞。24 h 后, 根据制造商的协议, 使用荧光素酶活性检测试剂盒检测 CAL-27 细胞的荧光素酶活性。

将 si-circNEIL3、si-NC、pcDNA-circNEIL3、pcDNA-NC 分别转染至 CAL-27 细胞以敲低/过表达 circNEIL3, 并将其分别命名为 si-circNEIL3 组、si-NC 组、pcDNA-circNEIL3 组、pcDNA-NC 组。转染 48 h 后, 收集细胞并采用 qRT-PCR 测定细胞中 circNEIL3、miR-218-5p 的表达水平。

1.2.7 Western blot 分析 Bax、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3 蛋白表达情况 转染后先收集各组 CAL-27 细胞。用 RIPA 裂解液提取总蛋白。50 μ g 蛋白质样品经 SDS-PAGE 分离后转到聚偏二氟乙烯膜上。将膜在 37 $^{\circ}$ C 下用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 再将膜在 4 $^{\circ}$ C 与 Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、caspase-3(1:1 000)、cleaved-caspase-3(1:1 000)、GAPDH(1:2 000) 一抗孵

育过夜。第二天,用二抗(1:3 000)在37 °C下孵育2 h。ECL显影后,应用Quantity One软件分析蛋白灰度值。

1.3 统计学分析

所有统计分析均使用SPSS 21.0软件,计量资料表示为均值±标准差($\bar{x}\pm s$)。统计分析采用独立样本 t 检验(两组比较)或采用单因素方差分析(多组比较)。 $P<0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 circNEIL3、miR-218-5p在口腔鳞癌中的表达情况

口腔鳞癌组织中 circNEIL3 的表达量高于癌旁组织(3.27 ± 0.45 vs 1.04 ± 0.15 , $t=30.828$, $P<0.01$), miR-

218-5p 的表达量低于癌旁组织(0.47 ± 0.07 vs 0.99 ± 0.16 , $t=19.525$, $P<0.01$); Pearson 相关性分析结果显示,口腔鳞癌组织中 circNEIL3 的表达水平与 miR-218-5p 的水平呈负相关($r=-0.562$, $P<0.01$, 图1)。此外,与人正常口腔角质细胞 HOK 相比,人口腔鳞癌细胞 (CAL-27、SCC-25、SCC-9 和 HSC-3) 中 circNEIL3 的表达量显著升高($P<0.05$), miR-218-5p 的表达量显著降低($P<0.05$, 图2)。其中 CAL-27 细胞中 circNEIL3 的表达量明显高于其他细胞系, miR-218-5p 的表达量明显低于其他细胞系,故选择 CAL-27 细胞进行后续实验。

2.2 沉默 circNEIL3 对口腔鳞癌 CAL-27 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

si-circNEIL3 组 miR-218-5p 的表达量、细胞

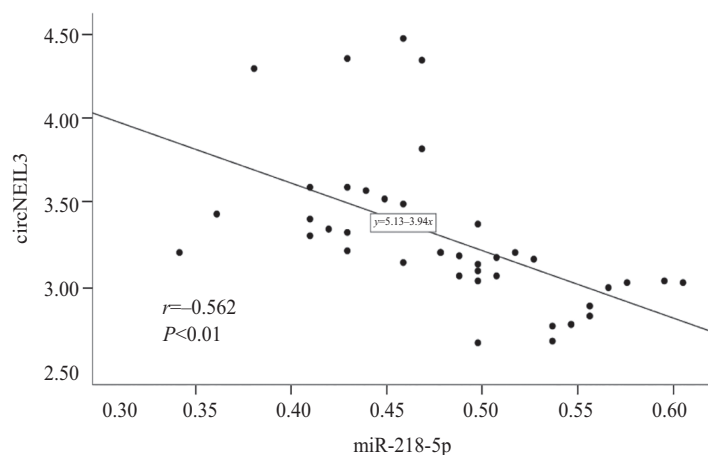
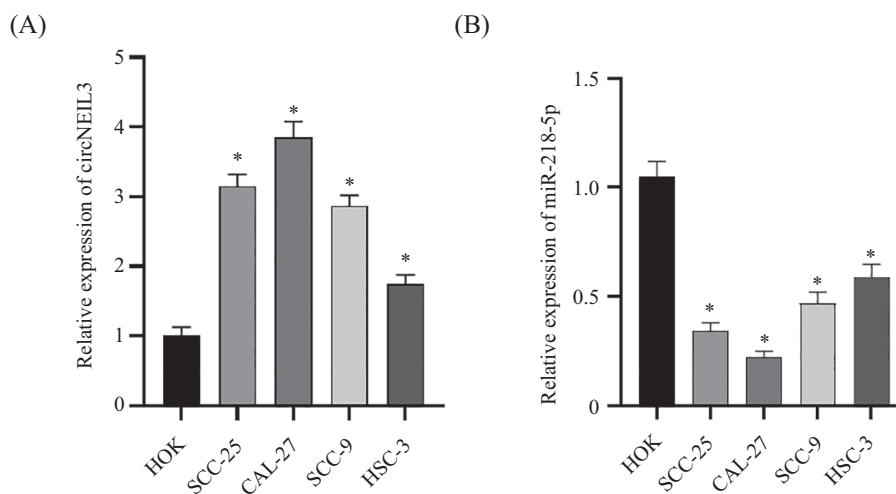


图1 口腔鳞癌组织中 circNEIL3 与 miR-218-5p 表达水平的相关性分析

Fig.1 Correlation analysis of expression levels of circNEIL3 and miR-218-5p in oral squamous cell carcinoma tissue



A: circNEIL3 的相对表达水平; B: miR-218-5p 的相对表达水平。* $P<0.05$, 与 HOK 细胞相比。

A: relative expression level of circNEIL3; B: relative expression level of miR-218-5p. * $P<0.05$ compared with HOK cells.

图2 不同口腔鳞癌细胞中 circNEIL3、miR-218-5p 表达水平的比较

Fig.2 Comparison of the expression levels of circNEIL3 and miR-218-5p in different oral squamous cell carcinoma cells

增殖抑制率、凋亡率和Bax、caspase-3、cleaved-caspase-3蛋白水平均高于si-NC组($P<0.01$), Bcl-2蛋白水平、迁移细胞数和侵袭细胞数较低于si-NC组($P<0.01$, 图3、图4和表1)。

2.3 circNEIL3靶向负调控miR-218-5p表达

circNEIL3和miR-218-5p存在互补序列(图5)。与miR-NC组比较, miR-218-5p组转染WT-circNEIL3质粒细胞的荧光素酶活性降低($P<0.01$); MUT-circNEIL3荧光素酶活性差异无统计学意义(图6)。此外, 与si-NC组(1.00 ± 0.00)相比, si-circNEIL3组miR-218-5p的表达量(3.20 ± 0.09)显著升高($t=73.333$, $P<0.01$); 与pcDNA-NC组(1.00 ± 0.00)相比, pcDNA-circNEIL3组miR-218-5p的表达量(0.37 ± 0.05)显著降

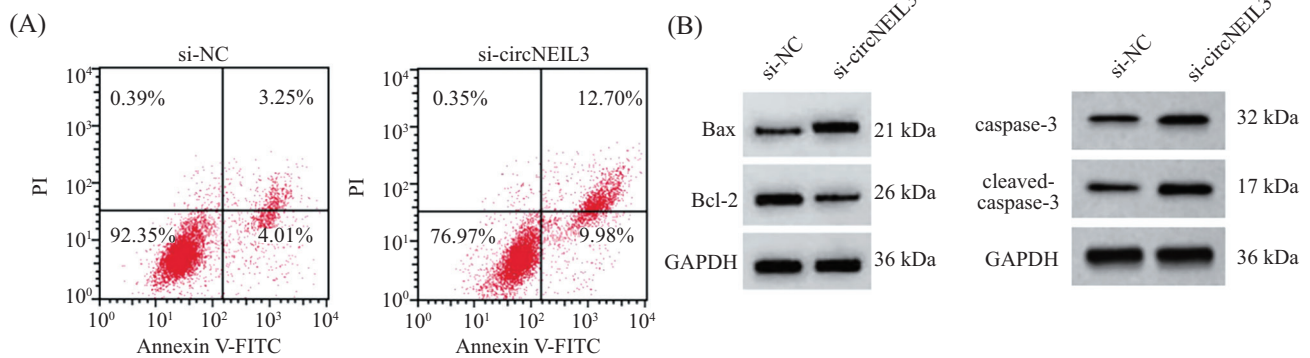
低($t=37.800$, $P<0.01$)。以上结果表明, circNEIL3靶向负调控miR-218-5p的表达。

2.4 miR-218-5p对口腔鳞癌CAL-27细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭的影响

与miR-NC组比较, miR-218-5p组迁移细胞数和侵袭细胞数减少($P<0.01$), 细胞中Bcl-2蛋白水平降低($P<0.01$), 细胞增殖抑制率、凋亡率和Bax、caspase-3、cleaved-caspase-3蛋白水平升高($P<0.01$, 图7、图8和表2)。

2.5 下调miR-218-5p减弱沉默circNEIL3对口腔鳞癌CAL-27细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭的影响

si-circNEIL3+anti-miR-218-5p组细胞增殖抑制率、凋亡率、Bax、caspase-3、cleaved-caspase-3蛋白水平



A: 流式细胞术检测CAL-27细胞凋亡情况; B: Western blot检测Bax、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3蛋白表达情况。

A: flow cytometry was used to detect CAL-27 cell apoptosis; B: Bax, Bcl-2, caspase-3, cleaved-caspase-3 protein levels were detected by Western blot.

图3 沉默circNEIL3促进口腔鳞癌CAL-27细胞凋亡

Fig.3 Silencing circNEIL3 promotes apoptosis of oral squamous cell carcinoma CAL-27 cells

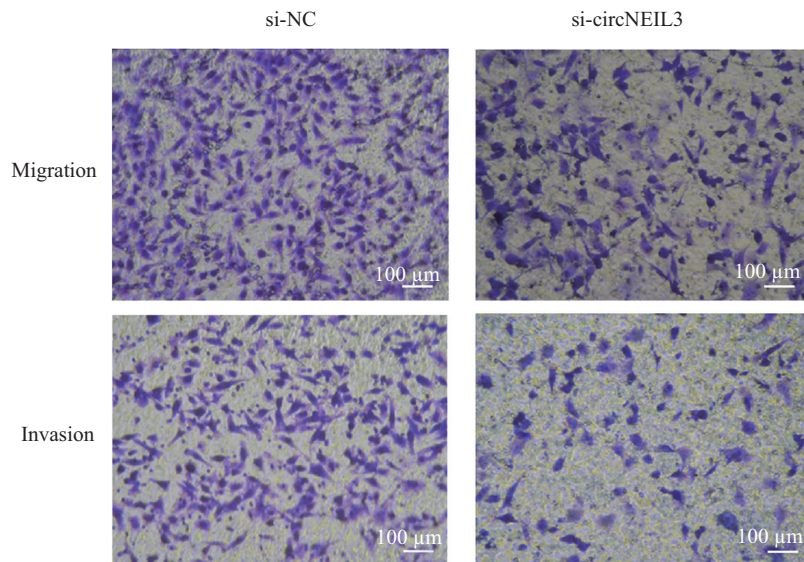


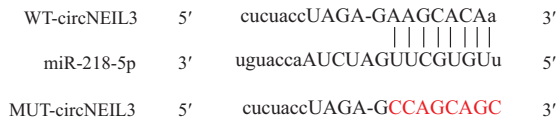
图4 沉默circNEIL3抑制口腔鳞癌CAL-27细胞迁移、侵袭

Fig.4 Silencing circNEIL3 inhibits the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma CAL-27 cells

表1 沉默circNEIL3抑制口腔鳞癌CAL-27细胞增殖、迁移和侵袭并促进细胞凋亡

Table 1 Silencing circNEIL3 inhibits the proliferation, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma CAL-27 cells and promotes apoptosis

分组 Group	circ-NEIL3	miR-218-5p	增殖抑制率/% Proliferation inhibition rate /%	凋亡率/% Apoptosis rate /%	Bax	Bcl-2	caspase-3	cleaved-caspase-3	迁移细胞数 Number of migrating cells	侵袭细胞数 Number of invasive cells
si-NC	1.00±0.00	1.00±0.00	0.00±0.00	7.17±0.61	0.26±0.03	0.77±0.07	0.21±0.02	0.28±0.04	180.89±9.10	145.67±6.85
si-circ-NEIL3	0.36±0.05	3.20±0.09	45.68±2.37	22.61±1.44	0.63±0.04	0.25±0.02	0.57±0.04	0.79±0.06	78.00±4.76	59.11±4.70
<i>t</i>	38.400	73.333	57.823	29.619	22.200	21.428	24.150	21.217	30.056	31.259
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

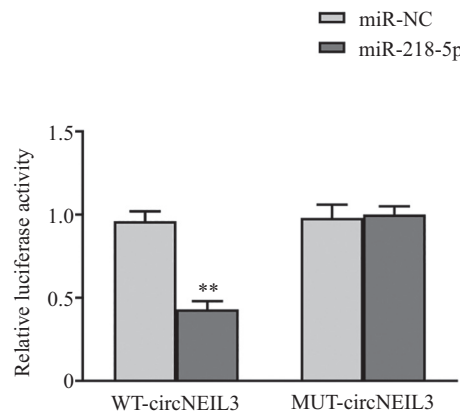


红色为突变的结合位点。

Red represents the binding site of the mutation.

图5 starBase数据库预测的circNEIL3和miR-218-5p的结合序列

Fig.5 Binding sequence of circNEIL3 and miR-218-5p predicted by starBase database

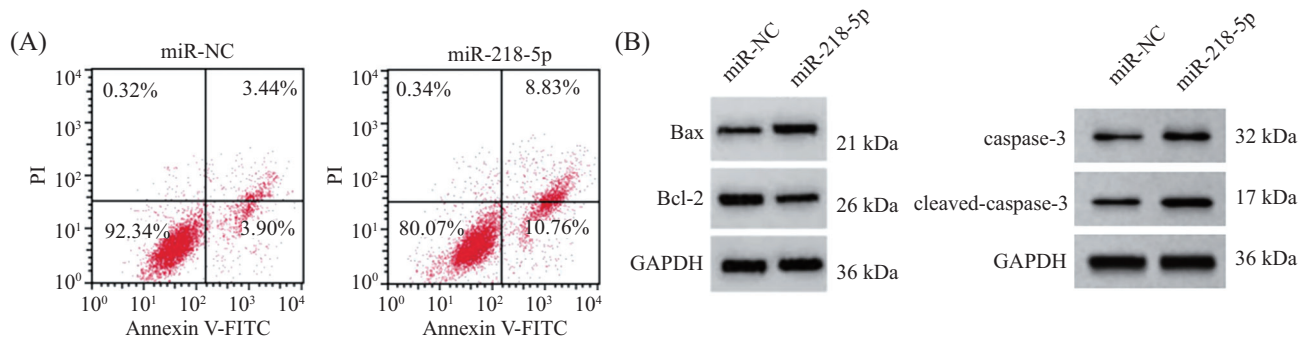


***P*<0.01, 与miR-NC组比较。

***P*<0.01 compared with miR-NC group.

图6 相对荧光素酶活性比较

Fig.6 Comparison of relative luciferase activities



A: 流式细胞术检测CAL-27细胞凋亡情况; B: Western blot检测Bax、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3蛋白表达情况。

A: flow cytometry was used to detect CAL-27 cell apoptosis; B: Bax, Bcl-2, caspase-3, cleaved-caspase-3 protein expression were detected by Western blot.

图7 miR-218-5p对口腔鳞癌CAL-27细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.7 Effects of miR-218-5p on apoptosis and expression of apoptosis-related proteins in oral squamous cell carcinoma CAL-27 cells

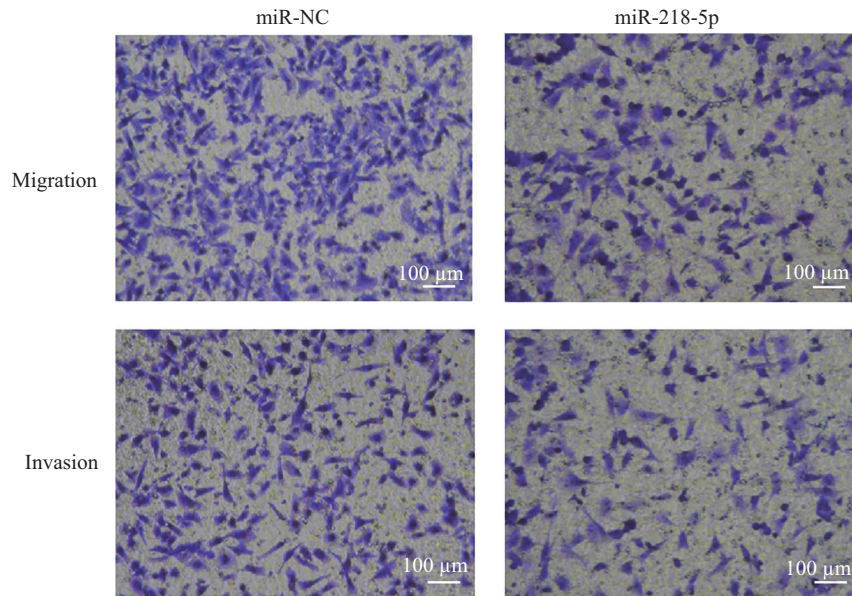


图8 miR-218-5p抑制口腔鳞癌CAL-27细胞迁移、侵袭

Fig.8 miR-218-5p inhibits the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma CAL-27 cells

表2 miR-218-5p抑制口腔鳞癌CAL-27细胞增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡

Table 2 miR-218-5p inhibits the proliferation, migration and invasion of oral squamous cell carcinoma CAL-27 cells and promotes cell apoptosis

分组	miR-218-5p	增殖抑制率/% Proliferation inhibition rate /%	凋亡率/% Apoptosis rate /%	迁移细胞数 Number of migrating cells	侵袭细胞数 Number of invasion cells	Bax	Bcl-2	caspase-3	cleaved-caspase-3
miR-NC	1.00±0.00	0.00±0.00	7.23±0.48	178.67±9.84	144.11±9.18	0.25±0.02	0.75±0.07	0.22±0.03	0.27±0.03
miR-218-5p	2.32±0.12	37.12±2.47	19.56±1.04	92.22±5.94	74.22±4.57	0.48±0.05	0.36±0.04	0.43±0.04	0.61±0.06
<i>t</i>	33.000	45.085	32.294	22.564	20.446	12.813	14.512	12.600	15.205
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

均低于 si-circNEIL3+anti-miR-NC组 ($P<0.01$), 迁移及侵袭细胞数、Bcl-2蛋白水平平均高于 si-circNEIL3+anti-miR-NC组 ($P<0.01$, 图9、图10和表3)。

3 讨论

circRNA通过吸附miRNA而解除miRNA对靶基因表达或翻译的抑制作用, 并可能作为口腔鳞癌诊断的潜在生物学标志物, 其在口腔鳞癌发生及发展过程中可发挥重要调控作用^[11-12]。circRNA在口腔鳞癌中表达上调或下调, 并可通过靶向结合miRNA而调控其靶基因表达从而发挥癌基因或抑癌基因作用^[13-14]。

circNEIL3在胰腺导管腺癌中表达水平升高, 并可促进胰腺导管腺癌细胞生长及转移^[15]。在宫颈癌细胞中 circNEIL3表达上升, 高表达的 circNEIL3通过

调控 miR-137/KLF12轴促进宫颈癌细胞增殖^[16]。但 circNEIL3在口腔鳞癌组织中的表达趋势及其对口腔鳞癌细胞生物学行为的影响尚未可知。本研究结果显示, 口腔鳞癌组织中 circNEIL3的表达高于癌旁组织。为了进一步研究 circNEIL3对口腔鳞癌细胞生物学性能的作用, 本研究在 CAL-27细胞中构建了 circNEIL3敲低模型。结果表明, 沉默 circNEIL3表达能够提高口腔鳞癌 CAL-27细胞增殖抑制率, 表明沉默 circNEIL3表达可抑制口腔鳞癌细胞增殖。Bcl-2家族蛋白(Bcl-2、Bax)是细胞凋亡的重要调节蛋白, Bcl-2抑制细胞凋亡, 且 Bcl-2可阻止 Bax基因的表达, 而 Bax促进细胞凋亡。Bax的促凋亡机制是通过促进细胞色素c的释放来实现的, 细胞色素c可以激活 caspase-3并与 Bcl-2形成二聚体, 进而导致DNA损伤和细胞凋亡^[17-18]。本研究结果显示, 沉默 circNEIL3表达

后口腔鳞癌细胞凋亡率及Bax、caspase-3、cleaved-caspase-3蛋白水平升高, Bcl-2的表达水平下调, 表明沉默circNEIL3诱导口腔鳞癌细胞凋亡, 可能与调节凋亡相关蛋白表达有关。同时本研究发现, 沉默circNEIL3表达可抑制口腔鳞癌细胞迁移及侵袭。以上研究结果均提示, circNEIL3的高表达可能与口腔鳞癌的进展密切相关。此外, 在本研究中, cleaved-caspase-3蛋白水平升高的同时, 总的caspase-3含量也增加, 推测其原因可能是因为细胞凋亡发生时, pro caspase-3被激活之后, 上游会继续表达 pro caspase-3, 所以总的caspase-3含量会增加; 但是总的caspase-3是没有活性的, cleaved-caspase-3才是有活性的, 作为凋亡指标, cleaved-caspase-3的表达水平是反映细胞凋亡的重要指标。

目前, circRNA已被证明可通过海绵吸附miRNA和抑制细胞内miRNA功能来发挥竞争内源性RNA(competitive endogenous RNA, ceRNA)的功能^[19]。因此, 建立circRNA对miRNA的调控网络可能有助于进一步了解肿瘤进展的分子机制, 为肿瘤的临床治疗提供潜在的治疗靶点。生物信息学分析预测了miR-218-5p在circNEIL3中的潜在结合位点, 荧光素酶报告实验证实了miR-218-5p和circNEIL3在CAL-27细胞中的直接相互作用。此外, Pearson相关性分析结果显示, 口腔鳞癌组织中circNEIL3的表达水平与miR-218-5p的水平呈负相关; 推测circNEIL3可能通过调控miR-218-5p表达参与口腔鳞癌的发生和发展。在本研究中, 沉默circNEIL3后, CAL-27细胞中miR-218-5p表达水平升高, 而过表达circNEIL3后, CAL-27细胞中miR-218-5p表达水平降低; 提示circNEIL3可靶向负调控miR-218-5p的表达。研究表明, miR-218-5p表达下调可通过激活CD44-ROCK信号通路而促进口腔鳞癌细胞侵袭^[20]。miR-218-5p在非小细胞肺癌和膀胱癌细胞中低表达, 并可阻碍细胞生长^[21-22]。本研究发现, 口腔鳞癌组织中miR-218-5p的表达量低于癌旁组织, 这与ZHAO等^[23]的研究结果一致, 且miR-218-5p与circNEIL3表达趋势相反。同时, 过表达miR-218-5p可降低口腔鳞癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力, 并可提高细胞凋亡能力, 提示miR-218-5p在口腔鳞癌中发挥抗癌作用。为了研究circNEIL3是否通过调节miR-218-5p促进口腔鳞癌的进展, 本研究将anti-miR-218-5p转染到沉默circNEIL3的CAL-27细胞中。结果显示, 下调miR-218-5p表达可减弱沉默circNEIL3

对口腔鳞癌细胞生物学行为的作用。提示circNEIL3可通过靶向抑制miR-218-5p促进口腔鳞癌的恶性进展。但miR-218-5p的下游调控靶点及相关分子机制仍需进一步研究。有报道显示, CD44-ROCK信号通路是miR-218-5p参与口腔鳞癌进展的下游通路^[20]。circNEIL3/miR-218-5p在口腔鳞癌恶性进展中的作用机制是否与CD44-ROCK信号通路有关, 在未来的研究中将对此进行深入分析并结合体内实验进行验证。此外, circNEIL3可调节多个靶miRNA从而影响肿瘤细胞的功能, 除miR-218-5p外, circNEIL3能否通过调控其他miRNA参与口腔鳞癌进展, 仍需探讨。

综上所述, circNEIL3在口腔鳞癌患者中表达增加, 沉默circNEIL3可能通过增加miR-218-5p表达促进细胞凋亡, 阻碍口腔鳞癌细胞增殖、迁移及侵袭。我们认为靶向调控circNEIL3表达可能是口腔鳞癌治疗的新思路。

参考文献 (References)

- [1] ZHAO W, CUI Y, LIU L, et al. Splicing factor derived circular RNA circUHRF1 accelerates oral squamous cell carcinoma tumorigenesis via feedback loop [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(3): 919-33.
- [2] MENG Y, ZHAO E Y, ZHOU Y, et al. Circular RNA hsa_circ_0011946 promotes cell growth, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma by upregulating PCNA [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(14): 7560-70.
- [3] ZHENG X, DU F, GONG X, et al. Circ_0005320 promotes oral squamous cell carcinoma tumorigenesis by sponging microRNA-486-3p and microRNA-637 [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 440-54.
- [4] SU Z, PAN C, XIE H, et al. Downregulation of circLPAR3 inhibits tumor progression and glycolysis by liberating miR-144-3p and upregulating LPCAT1 in oral squamous cell carcinoma [J]. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 2022, 7(2): 425-36.
- [5] LI Z, ZHANG J, JIANG Y, et al. Circular ribonucleic acid neil-like deoxyribonucleic acid glycosylase 3 governs the microribonucleic acid-3150b-3p/laminin subunit gamma 1 network to partially promote the development of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatol Res*, 2021, 51(6): 702-14.
- [6] ZHANG T, WU D M, LUO P W, et al. CircNEIL3 mediates pyroptosis to influence lung adenocarcinoma radiotherapy by upregulating PIF1 through miR-1184 inhibition [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2): 167.
- [7] PAN Z, ZHAO R, LI B, et al. EWSR1-induced circNEIL3 promotes glioma progression and exosome-mediated macrophage immunosuppressive polarization via stabilizing IGF2BP3 [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 16.
- [8] CRUZ-DE LA ROSA M I, JIMÉNEZ-WENCES H, ALARCÓN-MILLÁN J, et al. miR-218-5p/RUNX2 axis positively regulates proliferation and is associated with poor prognosis in cervical

- cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 6993.
- [9] CHEN G, WANG Q, WANG K. MicroRNA-218-5p affects lung adenocarcinoma progression through targeting endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10061-70.
- [10] ZHAO Y, YAO R. Long non-coding RNA HOXA-AS3 promotes cell proliferation of oral squamous cell carcinoma through sponging microRNA miR-218-5p [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8724-37.
- [11] 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]. *Cancer Res*, 2021, 81(2): 344-55.
- [12] YANG Y, CI H S, MAO Y L, et al. CircRNA_002178 promotes the proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma cells by activating the Akt/mTOR pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(11): 6122-30.
- [13] ZHANG Y, TANG K, CHEN L, et al. Exosomal circGDI2 suppresses oral squamous cell carcinoma progression through the regulation of miR-424-5p/SCAI axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12(1): 7501-14.
- [14] PENG Q S, CHENG Y N, ZHANG W B, 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): 112-23.
- [15] SHEN P, YANG T, CHEN Q, et al. CircNEIL3 regulatory loop promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression via miRNA sponging and A-to-I RNA-editing [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 51-61.
- [16] CHEN Y, GENG Y, HUANG J, et al. CircNEIL3 promotes cervical cancer cell proliferation by adsorbing miR-137 and upregulating KLF12 [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 34-44.
- [17] SUN S, CUI Z, YAN T, et al. CCN5 inhibits proliferation and promotes apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(4): 998-1008.
- [18] FEI Y, SHAN W, CHEN X. MiR-503-5p functions as an oncogene in oral squamous cell carcinoma by targeting Smad7 [J]. *Histol Histopathol*, 2020, 35(8): 893-901.
- [19] CHEN X, CHEN J, FU L, et al. Circ_0014359 promotes oral squamous cell carcinoma progression by sponging miR-149 [J]. *Acta Biochim Pol*, 2022, 69(2): 315-20.
- [20] LI X, HE J, SHAO M, et al. Downregulation of miR-218-5p promotes invasion of oral squamous cell carcinoma cells via activation of CD44-ROCK signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106(1): 646-54.
- [21] WANG J, SHU H Z, XU C Y, et al. LncRNA DGCR5 promotes non-small cell lung cancer progression via sponging miR-218-5p [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(20): 10303-13.
- [22] LI Y, SHI B, DONG F, et al. LncRNA KCNQ1OT1 facilitates the progression of bladder cancer by targeting MiR-218-5p/HS3ST3B1 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2021, 28(3/4): 212-20.
- [23] ZHAO Y, YAO R. Long non-coding RNA HOXA-AS3 promotes cell proliferation of oral squamous cell carcinoma through sponging microRNA miR-218-5p [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8724-37.