

• 论 著 •

circNRIP1 上调宫颈癌细胞 PD-L1 表达诱导 CD8⁺T 细胞的耗竭研究*严铃铃, 张小霞, 曹晓莉[△]

南通市肿瘤医院检验科, 江苏南通 226000

摘要:目的 探究宫颈癌细胞环状 RNA 核受体相互作用蛋白 1(circNRIP1)表达对 CD8⁺T 细胞的耗竭的影响及机制。方法 采用实时定量 PCR 检测 circNRIP1 在宫颈上皮细胞 HCerEpic 和宫颈癌细胞 C-33 A、Hela、SiHa、CS121 中的表达水平,将 C-33 A 细胞分为 Vector 组、circNRIP1 组和 circNRIP1+miR-138-5p 组,CS121 细胞分为 sh-NC 组、sh-circNRIP1 组和 sh-circNRIP1+miR-138-5p inhibitor。提取人外周血 CD8⁺T 细胞,Vector 组和 circNRIP1 组 C-33 A 细胞与 CD8⁺T 细胞共孵育 24 h(CD8⁺T/Vector 组和 CD8⁺T/circNRIP1 组),sh-NC 组和 sh-circNRIP1 组 CS121 细胞与 CD8⁺T 细胞共孵育 24 h(CD8⁺T/sh-NC 组和 CD8⁺T/sh-circNRIP1 组)。采用细胞毒性实验检测 CD8⁺T 细胞的杀伤能力,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清白细胞介素(IL)-2、 γ 干扰素(IFN- γ)和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平,流式细胞术检测 CD8⁺T 细胞程序性死亡受体 1(PD1)、T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白分子-3(TIM3)、淋巴细胞活化因子 3(LAG3)表达水平。利用双荧光素酶报告基因实验验证 circNRIP1 和 miR-138-5p 的靶向关系,以及 miR-138-5p 和 PD-L1 的靶向关系。结果 C-33 A、Hela、SiHa、CS121 细胞中 circNRIP1 表达水平显著高于 HCerEpic 细胞($P<0.05$)。CD8⁺T 细胞对 circNRIP1 组 C-33 A 细胞杀伤能力低于其对 Vector 组细胞的杀伤。CD8⁺T/circNRIP1 组 CD8⁺T 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 水平显著低于 CD8⁺T/Vector 组 CD8⁺T 细胞($P<0.05$),CD8⁺T/circNRIP1 组 CD8⁺T 细胞 PD-1、LAG-3、TIM-3 显著高于 CD8⁺T/Vector 组 CD8⁺T 细胞($P<0.05$)。CD8⁺T 细胞对 sh-circNRIP1 组 CS121 细胞杀伤能力高于其对 sh-NC 组细胞的杀伤($P<0.05$)。CD8⁺T/sh-circNRIP1 组 CD8⁺T 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 水平显著高于 CD8⁺T/sh-NC 组($P<0.05$),CD8⁺T/sh-circNRIP1 组 CD8⁺T 细胞 PD-1、LAG-3、TIM-3 显著低于 CD8⁺T/sh-NC 组($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-138-5p 为 circNRIP1 的靶基因,PD-L1 为 miR-138-5p 的靶基因。结论 circNRIP1 可通过上调 PD-L1 的表达而诱导 CD8⁺T 细胞的耗竭。

关键词: 宫颈癌; circNRIP1; CD8⁺T 细胞; 耗竭**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2025.12.014**中图法分类号:**R737.33;R446.6**文章编号:**1673-4130(2025)12-1485-07**文献标志码:**AcircNRIP1 induces CD8⁺T cells by upregulating PD-L1 expression in cervical cancer cells*YAN Lingling, ZHANG Xiaoxia, CAO Xiaoli[△]

Department of Clinical Laboratory, Nantong Cancer Hospital, Nantong, Jiangsu 226000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of circular RNA nuclear receptor interacting protein 1 (circNRIP1) expression on exhaustion of CD8⁺T cells in cervical cancer cells. **Methods** Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of circNRIP1 in cervical epithelial cells HCerEpic and cervical cancer cells C-33A, Hela, SiHa, and CS121. C-33A cells were divided into Vector group, circNRIP1 group, and circNRIP1+miR-138-5p group, while CS121 cells were divided into sh-NC group, sh-circNRIP1 group, and sh-circNRIP1+miR-138-5p inhibitor. Human peripheral blood CD8⁺T cells were extracted, and C-33A cells in Vector group and circNRIP1 group were co-incubated with CD8⁺T cells for 24 hours (CD8⁺T/Vector group and CD8⁺T/Vector group). CS121 cells in sh-NC group and sh-circNRIP1 group were co-incubated with CD8⁺T cells for 24 hours (CD8⁺T/sh NC group and CD8⁺T/sh-circNRIP1 group). Cytotoxicity

* 基金项目:2022 年度南通市卫生健康委员会科研课题项目(MSZ2022030)。

作者简介:严铃铃,女,主管技师,主要从事免疫学检验研究。 [△] 通信作者, E-mail:237254104@qq.com。

experiments were conducted to detect the killing ability of CD8⁺ T cells, ELISA was used to detect the levels of interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ , and tumor necrosis factor (TNF)- α in the cell supernatant. Flow cytometry was used to detect the expression of programmed death receptor-1 (PD-1), T cell Immunoglobulin domain and Mucin domain protein-3 (TIM3), and lymphocyte activation gene 3 (LAG3) in CD8⁺ T cells. Dual luciferase reporter gene experiments were conducted to verify the targeting relationship between circNRIP1 and miR-138-5p, as well as the targeting relationship between miR-138-5p and PD-L1. **Results** The expressions of circNRIP1 in C-33A, Hela, SiHa, and CS121 cells were significantly higher than those in HCEpic ($P<0.05$). The killing ability of CD8⁺ T cells against C-33A cells in the circNRIP1 group was lower than their killing ability against Vector group cells. The levels of IL-2, IFN- γ , and TNF- α secreted by CD8⁺ T cells in the CD8⁺ T/circNRIP1 group were significantly lower than those in the CD8⁺ T/Vector group ($P<0.05$), and the levels of PD-1, LAG-3, and TIM-3 expressed by CD8⁺ T cells in the CD8⁺ T/circNRIP1 group were also significantly higher than those in the CD8⁺ T/Vector group ($P<0.05$). The killing ability of CD8⁺ T cells against sh-circNRIP1 group CS121 cells was higher than their killing ability against sh-NC group cells ($P<0.05$). The levels of IL-2, IFN- γ , and TNF- α secreted by CD8⁺ T cells in the CD8⁺ T/sh-circNRIP1 group were significantly higher than those in the CD8⁺ T/sh-NC group ($P<0.05$). The PD-1, LAG-3, and TIM-3 levels of CD8⁺ T cells in the CD8⁺ T/sh-circNRIP1 group were also significantly lower than those in the CD8⁺ T/sh-NC group ($P<0.05$). The results of the dual-luciferase reporter gene experiment showed that miR-138-5p was the target gene of circNRIP1, and PD-L1 was the target gene of miR-138-5p. **Conclusion** circNRIP1 can induce the exhaustion of CD8⁺ T cells by upregulating the expression of PD-L1.

Key words: cervical cancer; circNRIP1; CD8⁺ T cells; exhaustion

宫颈癌是临床上常见的女性生殖系统恶性肿瘤，在女性恶性肿瘤中其发病率仅次于乳腺癌，位居第二，恶性程度和病死率高^[1-2]。虽然宫颈癌疫苗和宫颈癌筛查技术已取得突破性发展，提高其预防和诊断效果，但是宫颈癌患者仍存在较高的病死率和转移率^[3-4]。有研究指出，影响宫颈癌治疗和预后的重要因素为肿瘤的免疫逃逸，宫颈癌等肿瘤可通过高表达程序性死亡受体配体 1(PD-L1)等免疫检查点相关分子而抑制细胞毒性 CD8⁺ T 细胞的功能，并诱导 CD8⁺ T 细胞的耗竭，引起肿瘤免疫逃逸^[5-6]。因此，发现更多诱导免疫逃逸的分子，对于宫颈癌的免疫治疗至关重要。环状 RNA(circRNA)是一类特殊的内源性非编码 RNA，多种 circRNA 被发现具有调控宫颈癌生长、转移、免疫逃逸和放化疗抗性，具有成为肿瘤诊断和治疗新靶点的潜力^[7-8]。LI 等^[9]研究发现，环状 RNA 核受体相互作用蛋白 1(circNRIP1)在宫颈癌中呈显著高表达，并且可促进宫颈癌的迁移和侵袭。但是其对宫颈癌的免疫逃逸及免疫治疗的影响尚不清楚，本文即探究了 circNRIP1 在宫颈癌中的异常表达对 CD8⁺ T 的功能及耗竭的影响，旨在为宫颈癌的免疫治疗研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料来源 宫颈上皮细胞 HCEpic 和宫颈癌细胞 C-33 A、Hela、SiHa、CS121 购自美国典型培养

物保藏中心(ATCC)。
1.2 试剂与仪器 小鼠 CD8⁺ T 细胞磁珠法分选试剂盒(阴选法)购自苏州海狸生物医学工程有限公司，TransScript® Green One-Step RT-qPCR SuperMix 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司，CD8-BV510 抗体、程序性死亡受体 1(PD-1)-PE 抗体、LAG3-FITC 抗体和 TIM3-APC 抗体购自美国 Biolegend 公司，Lipofectamine™ 3000 试剂购自美国 ThermoFisher Scientific 公司，PD-L1 和 GAPDH 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司，双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司，肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-2 和 γ 干扰素(IFN- γ)检测试剂盒及细胞毒性试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与分组 HCEpic、C-33 A、Hela、SiHa、CS121 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，取对数生长期的 C-33 A 细胞，根据 Lipofectamine™ 3000 试剂盒，分别转染空白质粒(Vector 组)、转染 circNRIP1 过表达质粒(circNRIP1 组)、共转染 circNRIP1 过表达质粒和 miR-138-5p mimic(circNRIP1 + miR-138-5p 组)。取对数生长期的 CS121 细胞分别转染 circNRIP1 shRNA(sh-circNRIP1 组)、转染 circNRIP1 shRNA Negative Con-

trol(sh-NC 组)、共转染 circNRIP1 shRNA 和 miR-138-5p inhibitor 组 (sh-circNRIP1 + miR-138-5p inhibitor 组)。

1.3.2 CD8⁺T 细胞提取与培养 分离外周血单个核细胞,并调整细胞密度为 1×10⁸ 个/毫升,将 100 μL 细胞悬液加入无菌流式管底部,再加入 2 μL Biotin-Antibody Mix,混匀后 4 ℃ 孵育 10 min。孵育完成后,在流式管中加入 20 μL 清洗过的 Beaver-Beads[®] Streptavidin,混匀后 4 ℃ 孵育 10 min,磁力架分选 5 min,收集上清中的细胞,将其接种至 CD3 和 CD28 抗体包被的 24 孔板。

1.3.3 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 circNRIP1 和 miR-138-5p 表达 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,根据 TransScript[®] Green One-Step RT-qPCR SuperMix 试剂盒进行操作。引物序列见表 1。反应程序为 95 ℃ 1 min,95 ℃ 10 s,95 ℃ 30 s,共 40 个循环,仪器默认熔解曲线程序。使用 2^{-ΔΔC_t} 法计算基因相对表达水平。

表 1 引物序列	
基因	引物序列
circNRIP1	F:5'-TCCGGATGACATCAGAGCTAC-3'
	R:5'-TCAAGTGTGCATCTTCTGGCT-3'
β-actin	F:5'-TTGTTACAGGAAGTCCCTTGCC-3'
	R:5'-ATGCTATCACCTCCCCTGTGTG-3'
miR-138-5p	F:5'-CCAGCGTGAGCTGGTGGTTGTGAATC-3'
	R:5'-AGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'
U6	F:5'-CGCTTCGGCAGCACATATACTA-3'
	R:5'-GGAACGCTTCACGAATTTGC-3'

1.3.4 细胞毒性实验检测 CD8⁺T 细胞的杀伤功能 将 Vector 组和 circNRIP1 组 C-33 A 细胞与 CD8⁺T 细胞以 1 : 5 的比例 (CD8⁺T/Vector 组和 CD8⁺T/circNRIP1 组)共孵育 24 h,将 sh-NC 组和 sh-circNRIP1 组 CS1213 细胞与 CD8⁺T 细胞以 1 : 5 的比例 (CD8⁺T/sh-NC 组和 CD8⁺T/sh-circNRIP1 组)共孵育 24 h,酶标仪检测 490 nm 处各孔的吸光度 (A)值,裂解率=(A_{E+T} - A_E - A_T)/(A_{Emax} - A_E)×100%。其中,A_{E+T} 为共孵育孔的 A 值,A_E 为肿瘤细胞孔的 A 值,A_T 为 CD8⁺T 细胞孔的 A 值,A_{Emax} 为肿瘤细胞全部裂解的 A 值。

1.3.5 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测细胞上清 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α 水平 取 CD8⁺T/Vector 组和 CD8⁺T/circNRIP1 组共孵育体系以及 CD8⁺T/sh-NC 组和 CD8⁺T/sh-circNRIP1 组共孵育体系的上清液,根据 ELISA 检测试剂盒说明,每孔加入 20 μL 上

清液和 10 μL 生物素标记抗体,并加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记抗体,37 ℃ 孵育 30 min,加 10 μL 显色剂显色,酶标仪检测各孔 450 nm 处 A 值。

1.3.6 流式细胞术检测 CD8⁺T 细胞 PD-1、LAG3 和 TIM3 表达 取 CD8⁺T/Vector 组和 CD8⁺T/circNRIP1 组及 CD8⁺T/sh-NC 组和 CD8⁺T/sh-circNRIP1 组共孵育体系的细胞,重悬于 100 μL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液中,每孔分别加入 1 μL CD8-BV510 抗体、1 μL PD-1-PE 抗体、1 μL LAG3-FITC 抗体和 1 μL TIM3-APC 抗体 4 ℃ 孵育 30 min,清洗后,重悬于 500 μL PBS 中,流式细胞仪检测 CD8⁺T 细胞 PD-1、LAG3 和 TIM3 表达水平,计算 PD-1、LAG3 和 TIM3 表达的平均荧光强度 (MFI)。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验 根据文献[10] circNRIP1 与 miR-138-5p 具有靶向关系,使用 TargetsCan 数据库预测 circNRIP1 与 miR-138-5p 结合位点,根据文献[11]miR-138-5p 与 PD-L1 具有靶向关系,使用 miRDB 数据库预测 miR-138-5p 与 PD-L1 结合位点。根据 Lipofectamine[™]3000 试剂盒,将 circNRIP1 质粒 (circNRIP1 WT)、circNRIP1 突变质粒 (circNRIP1 MUT)、PD-L1 质粒 (PD-L1 WT) 和 PD-L1 突变质粒 (PD-L1 MUT) 转染至 293T 细胞,然后转染 miR-138-5p mimic 及阴性对照 (miR-NC),转染 48 h 后,将细胞接种至 96 孔板,双荧光素酶基因检测试剂盒检测各孔荧光强度。

1.3.8 蛋白质印迹 (Western blot) 检测 PD-L1 蛋白表达 RIPA 蛋白裂解液提取 Vector 组、circNRIP1 组和 circNRIP1 + miR-138-5p 组 C-33 A 细胞总蛋白,以及 sh-NC 组、sh-circNRIP1 组和 sh-circNRIP1 + miR-138-5p inhibitor 组 CS1213 细胞总蛋白,取 10 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),300 mA 恒流转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 膜,封闭后,PVDF 膜与 PD-L1 和 GAPDH 孵育过夜,洗膜后,与二抗室温孵育 1 h,洗膜后,根据 ECL 试剂盒显影并曝光。

1.4 统计学处理 用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

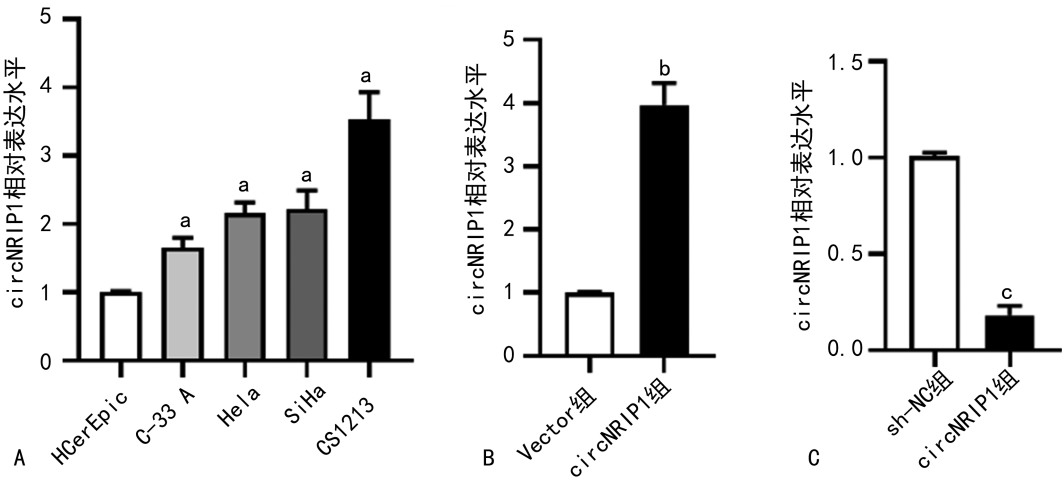
2 结 果

2.1 宫颈上皮细胞和宫颈癌细胞 circNRIP1 表达水平比较 RT-qPCR 结果显示,宫颈癌细胞 C-33 A、Hela、SiHa、CS1213 中 circNRIP1 的表达水平显著高于其在宫颈上皮细胞 HCerEpic 中的表达 (*P* < 0.05),circNRIP1 在 C-33 A 中表达水平最低,

CS1213 中表达水平最高,所以选择 C-33 A 细胞构建 circNRIP1 过表达细胞,选择 CS1213 细胞构建 circNRIP1 敲低细胞。circNRIP1 组 C-33 A 细胞中 circNRIP1 表达水平显著高于 Vector 组($P<0.05$),sh-circNRIP1 组 CS1213 细胞中 circNRIP1 表达水平显著低于 sh-NC 组($P<0.05$)。结果说明 circNRIP1 差异表达细胞株构建成功,可用于后续研究。见图 1。

2.2 宫颈癌细胞的 circNRIP1 表达对 CD8⁺T 细胞杀伤能力的影响 为探究宫颈癌细胞的 circNRIP1 表达是否可影响 CD8⁺T 细胞的杀伤能力,将 CD8⁺T 细胞与各组 C-33 A 和 CS1213 细胞共孵育,检测 CD8⁺T 细胞的细胞毒性及细胞因子的分泌。细胞毒

性实验结果显示,CD8⁺T 细胞对 circNRIP1 组 C-33 A 细胞杀伤能力显著低于其对 Vector 组 C-33 A 细胞杀伤能力($P<0.001$);CD8⁺T 细胞对 sh-circNRIP1 组 CS1213 细胞杀伤能力显著高于其对 sh-NC 组 CS1213 细胞杀伤能力($P<0.001$)。见表 2。CD8⁺T/circNRIP1 组细胞上清中 IL-2、INF- γ 、TNF- α 水平低于 CD8⁺T/Vector 组($P<0.01$)。CD8⁺T/sh-circNRIP1 组细胞上清中 IL-2、INF- γ 、TNF- α 水平高于 CD8⁺T/sh-NC 组($P<0.001$)。见表 3、4。上述结果说明宫颈癌细胞高表达 circNRIP1 可抑制 CD8⁺T 细胞对其杀伤能力。



注:A为 HCErEpic、C-33 A、HeLa、SiHa 和 CS1213 细胞 circNRIP1 相对表达水平比较(与 HCErEpic 细胞比较,^a $P<0.05$);B为 Vector 组和 circNRIP1 组 C-33 A 细胞 circNRIP1 相对表达水平比较(与 Vector 组 C-33 A 细胞比较,^b $P<0.05$);C为 sh-NC 组和 sh-circNRIP1 组 CS1213 细胞 circNRIP1 相对表达水平比较(与 sh-NC 组 CS1213 细胞比较,^c $P<0.05$)。

图 1 各组宫颈癌细胞 circNRIP1 相对表达水平比较

表 2 CD8⁺T 细胞对各组 C-33 A 和 CS1213 细胞杀伤能力比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	细胞裂解率	组别	细胞裂解率
CD8 ⁺ T/Vector 组	65.57±6.02	CD8 ⁺ T/sh-NC 组	40.00±5.00
CD8 ⁺ T/circNRIP1 组	32.33±7.50 ^a	CD8 ⁺ T/sh-circNRIP1 组	51.00±4.58 ^b

注:与 CD8⁺T/Vector 组比较,^a $P<0.05$;与 CD8⁺T/sh-NC 组比较,^b $P<0.05$ 。

表 3 CD8⁺T/Vector 组和 CD8⁺T/circNRIP1 组上清 IL-2、INF- γ 、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}$)

组别	IL-2	INF- γ	TNF- α
CD8 ⁺ T/Vector 组	143.30±11.50	123.00±7.94	153.00±10.82
CD8 ⁺ T/circNRIP1 组	96.33±7.09 ^a	89.02±11.26 ^a	105.70±8.62 ^a

注:与 CD8⁺T/Vector 组比较,^a $P<0.05$ 。

表 4 CD8⁺T/Vector 组和 CD8⁺T/circNRIP1 组上清 IL-2、INF- γ 、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}$)

组别	IL-2	INF- γ	TNF- α
CD8 ⁺ T/sh-NC 组	116.70±7.10	109.30±10.50	132.00±3.00
CD8 ⁺ T/sh-circNRIP1 组	170.00±5.00 ^a	137.00±5.29 ^a	154.30±6.65 ^a

注:与 CD8⁺T/sh-NC 组比较,^a $P<0.05$ 。

2.3 宫颈癌细胞的 circNRIP1 表达对 CD8⁺ T 细胞耗竭的影响 为探究宫颈癌细胞的 circNRIP1 表达对 CD8⁺ T 细胞耗竭的影响,流式细胞术检测各组 CD8⁺ T 细胞耗竭标志 PD-1、LAG-3 和 TIM-3 的表达,结果显示:CD8⁺ T/circNRIP1 组 CD8⁺ T 细胞

PD-1、LAG-3 和 TIM-3 MFI 显著高于 CD8⁺ T/Vec-tor 组($P<0.01$)。CD8⁺ T/sh-circNRIP1 组 CD8⁺ T 细胞 PD-1、LAG-3 和 TIM-3 MFI 显著低于 CD8⁺ T/Vector 组($P<0.001$),说明高表达 circNRIP1 的宫颈癌细胞可诱导 CD8⁺ T 细胞耗竭。见表 5、6。

表 5 CD8⁺ T/Vector 组和 CD8⁺ T/circNRIP1 组 CD8⁺ T 细胞 PD-1、LAG-3 和 TIM-3 的 MFI 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	PD-1	LAG-3	TIM-3
CD8 ⁺ T/Vector 组	976.70±87.37	1 285.00±30.41	702.70±67.09
CD8 ⁺ T/circNRIP1 组	2 724.00±622.40 ^a	1 645.00±278.20 ^a	1 238.00±80.11 ^a

注:与 CD8⁺ T/Vector 组比较,^a $P<0.05$ 。

表 6 CD8⁺ T/Vector 组和 CD8⁺ T/circNRIP1 组 CD8⁺ T 细胞 PD-1、LAG-3 和 TIM-3 的 MFI 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	PD-1	LAG-3	TIM-3
CD8 ⁺ T/sh-NC 组	1 123.00±92.92	1 573.00±91.19	1 041.00±61.71
CD8 ⁺ T/sh-circNRIP1 组	865.00±56.70 ^a	990.00±115.30 ^a	477.30±63.22 ^a

注:与 CD8⁺ T/sh-NC 组比较,^a $P<0.05$ 。

2.4 circNRIP1 与 miR-138-5p 靶向关系验证结果 数据库预测及双荧光素酶报告基因实验验证 circNRIP1 与 miR-138-5p 靶向关系,结果显示 circNRIP1 与 miR-138-5p 结合位点见图 2,共转染 miR-138-5p mimic 和 circNRIP1 WT 组细胞的荧光素酶活性低于共转染 miR-NC 和 circNRIP1 WT 组($P<0.05$),而共转染 miR-138-5p mimic 和 circNRIP1 MUT 后细胞的荧光素酶活性与共转染 miR-NC 和 circNRIP1 MUT 后的荧光素酶活性变化差异无统计学意义($P>0.05$),说明 miR-138-5p 为 circNRIP1 的靶基因。见图 3。

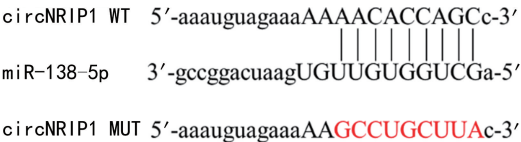
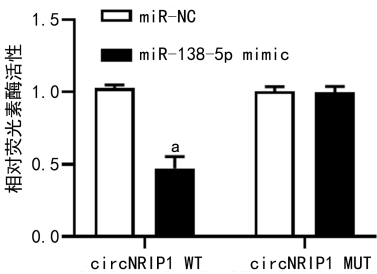


图 2 Targetscan 数据库预测 circNRIP1 与 miR-138-5p 结合位点



注:与 miR-NC 比较,^a $P<0.05$ 。

图 3 各组细胞相对荧光素酶活性比较

2.5 miR-138-5p 与 PD-L1 靶向关系验证结果 miR-138-5p 与 PD-L1 结合位点见图 4,共转染 miR-

138-5p mimic 和 PD-L1 WT 组细胞荧光素酶活性低于共转染 miR-NC 和 PD-L1 WT 组($P<0.05$)。而共转染 miR-138-5p mimic 和 PD-L1 MUT 后细胞的荧光素酶活性与共转染 miR-NC 和 PD-L1 MUT 后的荧光素酶活性变化差异无统计学意义($P>0.05$),说明 PD-L1 为 miR-138-5p 的靶基因。见图 5。

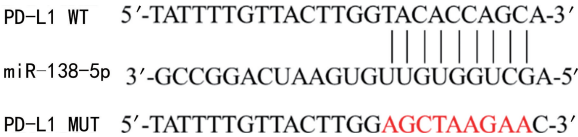
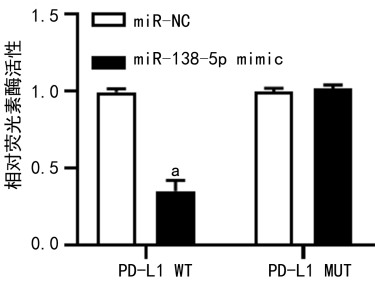


图 4 miRDB 数据库预测 miR-138-5p 与 PD-L1 结合位点

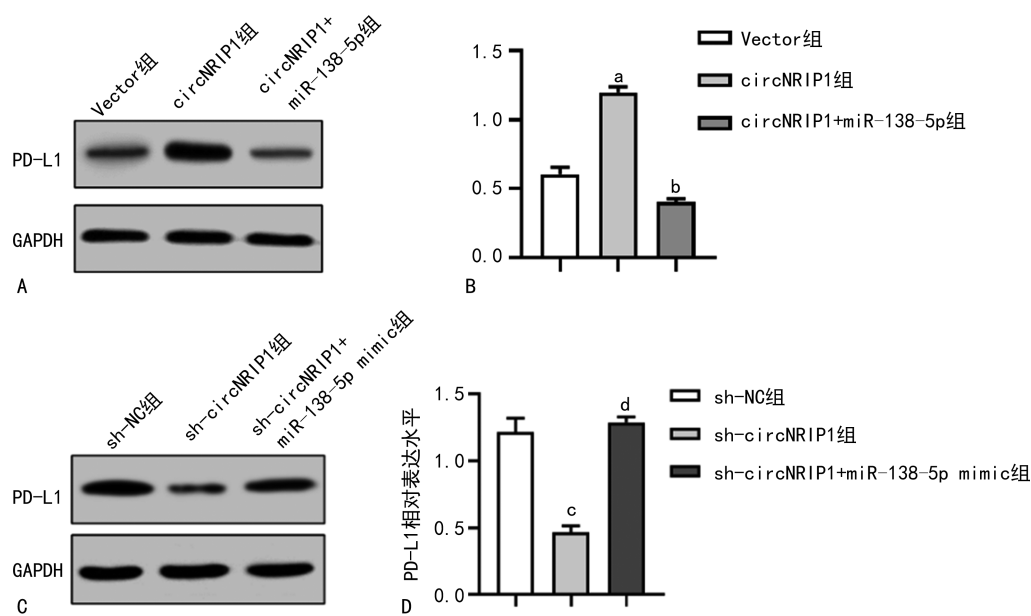


注:与 miR-NC 比较,^a $P<0.05$ 。

图 5 各组细胞相对荧光素酶活性比较

2.6 circNRIP1 靶向调控 miR-138-5p/PD-L1 信号轴验证结果 与 Vector 组比较,circNRIP1 组 C-33 A 细胞 PD-L1 表达显著上调($P<0.001$),而 circNRIP1+miR-138-5p 组 C-33 A 细胞 PD-L1 表达显著低于 circNRIP1 组($P<0.001$)。相比于 sh-NC 组,sh-circNRIP1 组 CS1213 细胞 PD-L1 表达显著下调($P<0.001$),sh-circNRIP1+miR-138-5p inhibitor 组 CS1213 细胞 PD-L1 表达显著高于 sh-circNRIP1

组($P<0.001$),提示 circNRIP1 靶向调控 miR-138-5p/PD-L1 信号轴。见图 6。



注:A、B 分别为各组 C-33 A 细胞 PD-L1 表达水平及统计分析结果(与 Vector 组比较,^a $P<0.05$;与 circNRIP1 组比较,^b $P<0.05$);C、D 分别为各组 CS1213 细胞 PD-L1 表达水平比较(与 sh-NC 组比较,^c $P<0.05$;与 sh-circNRIP1 组比较,^d $P<0.05$)。

图 6 Western blot 检测 C-33 A 细胞和 CS1213 细胞 PD-L1 表达

3 讨 论

随着宫颈癌疫苗的推广,宫颈癌的发病率已得到控制,但宫颈癌患者接受手术治疗及放化疗后仍然表现出较低的存活率,宫颈癌晚期患者的 5 年生存率仅约为 15%,且伴有宫颈癌的复发和转移^[12-13]。有研究指出,代谢紊乱、氧化应激以及免疫逃逸等因素均是造成宫颈癌复发和转移的重要原因^[14]。免疫检查点的异常表达可诱导多种免疫细胞的功能障碍,进而诱导肿瘤的免疫逃逸^[15],因此,发现更多对肿瘤免疫逃逸或免疫检查点表达具有调控作用的分子对于宫颈癌的免疫治疗具有重要意义。

circRNA 是一类环状非编码 RNA,与线性 RNA 不同,circRNA 没有 5'端帽子和 3'端的多聚腺苷酸尾巴,具有封闭的环状结构,不易被核酸外切酶,表达稳定,并且具有广泛的调控功能^[16-18]。在宫颈癌中多种 circRNA 被发现具有调控肿瘤免疫逃逸的功能,例如,ZHANG 等^[19]研究指出,circPRDM4 的表达上调可诱导化疗耐药的宫颈癌免疫逃逸;ZHANG 等^[20]研究发现 circ_0000276 可调控宫颈癌细胞的免疫浸润^[20]。YAN 等^[21]指出,circRNA 可作为调控宫颈癌组织免疫细胞功能,尤其是调控 CD8⁺T 细胞功能的关键分子。circNRIP1 是一类在宫颈癌中异常表达的 circRNA,可调控宫颈癌的生长和转移^[9]。本研究亦发现 circNRIP1 在宫颈癌细胞 C-33 A、Hela、SiHa、CS1213 中 circNRIP1 表达显著高于其在宫颈上皮细胞 HCerEpic 中的表达,但其对 CD8⁺T 细胞等免疫细胞的肿瘤浸润的影响尚不清楚。

CD8⁺T 细胞是机体主要的细胞毒性 T 淋巴细胞,对肿瘤细胞等抗原物质具有杀伤作用,与自然杀伤细胞构成机体抗病毒、抗肿瘤免疫的重要防线。CD8⁺T 细胞的浸润及活性对于肿瘤免疫治疗至关重要^[22]。本研究发现,宫颈癌细胞 C-33 A 过表达 circNRIP1 后,CD8⁺T 细胞对 C-33 A 细胞杀伤能力显著降低,细胞分泌杀伤因子 IL-2、INF- γ 、TNF- α 水平亦明显降低,并且与过表达 circNRIP1 的 C-33 A 细胞孵育后,CD8⁺T 细胞耗竭标志物 PD-1、LAG-3 和 TIM-3 表达显著上调。而抑制 CS1213 中 circNRIP1 表达后,CD8⁺T 细胞对 C-33 A 细胞杀伤能力显著增加,细胞分泌杀伤因子 IL-2、INF- γ 、TNF- α 的水平亦显著上升,并且与低表达 circNRIP1 的 CS1213 细胞孵育后,CD8⁺T 耗竭标志物 PD-1、LAG-3 和 TIM-3 表达显著下调。这说明 circNRIP1 的异常表达可影响 CD8⁺T 细胞对宫颈癌细胞的杀伤功能。

为探究 circNRIP1 的调控机制,本研究数据库预测及双荧光素酶报告基因实验发现 circNRIP1 可靶向调控 miR-138-5p/PD-L1 信号轴,即 circNRIP1 的高表达可上调宫颈癌细胞 PD-L1 的表达。PD-1/PD-L1 通路是使肿瘤细胞发生免疫逃逸的免疫抑制通路,在免疫调节和免疫耐受中均起关键作用,PD-1/PD-L1 信号通路的激活可诱导 CD8⁺T 细胞等免疫细胞的耗竭^[23]。BUDIMIR 等^[24]亦指出,PD-1/PD-L1 通路抑制剂可逆转 CD8⁺T 细胞的耗竭,抑制肿瘤免疫逃逸。而本研究结果证明了 circNRIP1 可激活宫颈癌细胞中 miR-138-5p/PD-L1 信号轴进而影响

CD8⁺ T 细胞的抗肿瘤活性。

综上所述,本研究表明 circNRIP1 可在宫颈癌细胞中显著高表达,并且 CD8⁺ T 对高表达 circNRIP1 的宫颈癌细胞杀伤能力减弱,高表达 circNRIP1 的宫颈癌细胞可诱导 CD8⁺ T 耗竭,其机制可能为 circNRIP1 调控 miR-138-5p/PD-L1 信号轴,诱导宫颈癌细胞 PD-L1 高表达。本研究的创新点在于发现 circNRIP1 可通过调控 PD-L1 的表达而影响肿瘤免疫,提示 circNRIP1 或可作为调控宫颈癌肿瘤免疫的新靶点。但是本研究的局限性在于仅在细胞水平验证,缺少动物体内实验验证,在后续的研究中本团队会在动物体内和临床水平进一步探究 circNRIP1 的功能及临床应用潜力。

参考文献

- [1] ZHETPISBAYEVA I, KASSYMBEKOVA F, SARMULDAYEVA S, et al. Cervical cancer prevention in rural areas[J]. *Ann Glob Health*, 2023, 89(1): 75-82.
- [2] LAKHMAN Y, AHERNE E A, JAYAPRAKASAM V S, et al. Staging of cervical cancer: a practical approach using MRI and FDG PET[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2023, 221(5): 633-648.
- [3] BUCK DISILVESTRO J, ULMER K K, HEDGES M, et al. Cervical cancer: preventable deaths among American Indian/Alaska Native Communities[J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2024, 51(1): 125-141.
- [4] VARGAS-CARDONA H D, RODRIGUEZ-LOPEZ M, AR-RIVILLAGA M, et al. Artificial intelligence for cervical cancer screening: scoping review, 2009 – 2022[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2024, 165(2): 566-578.
- [5] JAIN M, YADAV D, JAROULIYA U, et al. Epidemiology, molecular pathogenesis, immuno-pathogenesis, immune escape mechanisms and vaccine evaluation for HPV-associated carcinogenesis[J]. *Pathogens*, 2023, 12(12): 1380.
- [6] FERRALL L, LIN K Y, RODEN R B S, et al. Cervical cancer immunotherapy: facts and hopes[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(18): 4953-4973.
- [7] BEGLIARZADE S, SUFIANOV A, ILYASOVA T, et al. Circular RNA in cervical cancer: fundamental mechanism and clinical potential[J]. *Noncoding RNA Res*, 2023, 9(1): 116-124.
- [8] SHI Y, HE R, YANG Y, et al. Circular RNAs: novel biomarkers for cervical, ovarian and endometrial cancer[J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(5): 1787-1798.
- [9] LI X, MA N, ZHANG Y, et al. Circular RNA circNRIP1 promotes migration and invasion in cervical cancer by sponging miR-629-3p and regulating the PTP4A1/ERK1/2 pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 399-411.
- [10] XU G, LI M, WU J, et al. Circular RNA circNRIP1 sponges microRNA-138-5p to maintain hypoxia-induced re-

sistance to 5-fluorouracil through HIF-1 α -dependent glucose metabolism in gastric carcinoma[J]. *Cancer Manag Res*, 2022, 12(6): 2789-2802.

- [11] SONG N, LI P, SONG P, et al. MicroRNA-138-5p suppresses non-small cell lung cancer cells by targeting PD-L1/PD-1 to regulate tumor microenvironment[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 10(8): 540-552.
- [12] GAVINSKI K, DINARDO D. Cervical cancer screening[J]. *Med Clin North Am*, 2023, 107(2): 259-269.
- [13] KYRGIU M, MOSCICKI A B. Vaginal microbiome and cervical cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86 (Pt 3): 189-198.
- [14] VIVEROS-CARREÑO D, FERNANDES A, PAREJA R. Updates on cervical cancer prevention[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2023, 33(3): 394-402.
- [15] DURANTI S, PIETRAGALLA A, DANIELE G, et al. Role of Immune checkpoint inhibitors in cervical cancer: from preclinical to clinical data[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(9): 2089-2101.
- [16] KRISTENSEN L S, JAKOBSEN T, HAGER H, et al. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(3): 188-206.
- [17] LI J, SUN D, PU W, et al. Circular RNAs in cancer: biogenesis, function, and clinical significance[J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(4): 319-336.
- [18] WANG Y, CHEN X, YANG Y. CircRNA-regulated glucose metabolism in ovarian cancer: an emerging landscape for therapeutic intervention[J]. *Clin Transl Oncol*, 2024, 26(3): 584-596.
- [19] ZHANG Y, LI X, ZHANG J, et al. USF1 regulated circPRDM4 modulates tumorigenesis and immune escape in chemoresistant cervical cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(5): e17945.
- [20] ZHANG H, WANG X, LI Y, et al. The hsa_circ_0000276-ceRNA regulatory network and immune infiltration in cervical cancer[J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 222-241.
- [21] YAN W, JIN H, ZHANG X, et al. Identification of an immune signature to predict poor clinical outcome in cervical cancer[J]. *Epigenomics*, 2021, 13(11): 891-907.
- [22] PHILIP M, SCHIETINGER A. CD8⁺ T cell differentiation and dysfunction in cancer[J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(4): 209-223.
- [23] HASHIMOTO M, RAMALINGAM S S, AHMED R. Harnessing CD8 T cell responses using PD-1-IL-2 combination therapy[J]. *Trends Cancer*, 2024, 10(4): 332-346.
- [24] BUDIMIR N, THOMAS G D, DOLINA J S, et al. Reversing T-cell exhaustion in cancer: lessons learned from PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade[J]. *Cancer Immunol Res*, 2022, 10(2): 146-153.