

# LncRNA LINC01137 通过诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭促进非小细胞肺癌进展的机制研究

孙文泽<sup>1</sup>, 李守帅<sup>2</sup> (1. 西安交通大学第一附属医院放疗科, 西安 710061;  
2. 西安市中心医院普外科, 西安 710003)

**摘要:** **目的** 研究长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) LINC01137 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 免疫逃逸中的生物学功能及其潜在的调节机制。**方法** 采集 24 例健康志愿者和 24 例 NSCLC 患者血液样本, 并收集 NSCLC 肿瘤组织和癌旁组织检测 LINC01137 水平。利用 Starbase 数据库预测 LINC01137 与 miR-22-3p 的结合位点, 荧光素酶报告基因分析进行验证。采用 A549 细胞来源的外泌体和 / 或 sh-LINC01137 干扰序列转染 A549 细胞, 检测细胞增殖和侵袭能力; 收集转染后的细胞上清液培养 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 检测 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭标志物干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、颗粒酶 B (granzyme B) 和白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 水平, 以及 PD-1+Tim3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比。采用外泌体和 / 或 miR-22-3p 模拟物 (miR-22-3p mimic) 转染 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 检测 PD-1 蛋白水平。**结果** 与癌旁组织相比, NSCLC 肿瘤组织中 LINC01137 表达 ( $3.357 \pm 0.548$  vs  $1.011 \pm 0.371$ ) 明显升高; 与健康志愿者相比, NSCLC 患者外周血 LINC01137 表达 ( $3.216 \pm 0.342$  vs  $1.007 \pm 0.313$ ) 亦明显升高, 差异具有统计学意义 ( $t = -17.367, -17.147$ , 均  $P < 0.001$ )。肿瘤组织 LINC01137 表达与外周血中 LINC01137 表达呈正相关 ( $r = 0.755$ ,  $P < 0.05$ )。在 A549 细胞来源的外泌体中 LINC01137 显著富集。与 Exo+sh-NC 组相比, Exo+sh-LINC01137 组细胞活力 ( $65.852\% \pm 4.715\%$  vs  $100.153\% \pm 11.934\%$ ) 及细胞侵袭 ( $21.464\% \pm 3.481\%$  vs  $43.126\% \pm 1.447\%$ ) 能力显著降低, 差异具有统计学意义 ( $t = 4.630, 9.953$ , 均  $P < 0.01$ )。NSCLC 患者外周血中 LINC01137 表达和 CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比呈负相关 ( $r = -0.520$ ,  $P < 0.05$ )。与 Exo+sh-NC 组相比, Exo+sh-LINC01137 组 IFN- $\gamma$  ( $3\ 865.314 \pm 543.852$  pg/ml vs  $1\ 786.971 \pm 105.982$  pg/ml), TNF- $\alpha$  ( $4\ 631.930 \pm 510.715$  pg/ml vs  $1\ 973.242 \pm 379.623$  pg/ml), Granzyme B ( $3\ 876.496 \pm 312.438$  pg/ml vs  $1\ 879.439 \pm 287.584$  pg/ml) 和 IL-2 mRNA 水平 ( $3.286 \pm 0.437$  vs  $1.015 \pm 0.314$ ) 升高, PD-1+Tim3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比 ( $7.680\% \pm 2.185\%$  vs  $18.952\% \pm 3.216\%$ ) 降低, 差异具有统计学意义 ( $t = -6.497, -7.237, -8.146, -7.310, 5.021$ , 均  $P < 0.01$ )。miR-22-3p 是 LINC01137 的靶基因。与 Exo+NC mimic 组相比, Exo+miR-22-3p 组 PD-1 蛋白水平 ( $0.384 \pm 0.087$  vs  $1.003 \pm 0.147$ ) 显著降低, 差异具有统计学意义 ( $t = 6.277$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** NSCLC 患者肿瘤组织及外周血中 LINC01137 表达显著上调; NSCLC 细胞来源的外泌体中 LINC01137 通过靶向 CD8<sup>+</sup>T 细胞中 miR-22-3p 并抑制其表达, 诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭, 促进 NSCLC 细胞免疫逃逸。

**关键词:** 非小细胞肺癌; LINC01137; 外泌体; 微小核糖核酸-22-3p; CD8<sup>+</sup>T 细胞

**中图分类号:** R734.2; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 02-001-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2024.02.001

## Mechanism Study of LncRNA LINC01137 Promoting the Progression of Non-small Cell Lung Cancer by Inducing CD8<sup>+</sup>T Cell Exhaustion

SUN Wenzhe<sup>1</sup>, LI Shoushuai<sup>2</sup> (1. Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Department of General Surgery, Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the biological function of long non-coding RNA (LncRNA) LINC01137 in immune escape of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells and its potential regulatory mechanisms. **Methods** The blood samples of 24 healthy volunteers and 24 NSCLC patients were collected. The tumor tissues and paracancerous tissues of 24 NSCLC patients were collected, and the levels of LINC01137 were detected. The binding sites of LINC01137 and miR-22-3p were predicted by Starbase database and verified by the luciferase reporter gene analysis. A549 cells were transfected with exosomes derived from A549 cells and/or sh-LINC01137 interference sequence to detect cell proliferation and invasion. The

**基金项目:** 陕西省自然科学基金, 一般项目 (青年), NO: 2021JQ-403; MAP4K4 激活非 RAS 依赖 MAPK 轴促肺癌恶性行为机制研究。

**作者简介:** 孙文泽 (1986-), 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 肺癌放射治疗及包括化疗、靶向生物及免疫治疗的综合治疗, E-mail: fwv786G@163.com。

supernatant of A549 cells were collected to culture CD8<sup>+</sup>T cells, and the levels of CD8<sup>+</sup>T cell exhaustion markers, including interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), granzyme B and interleukin-2 (IL-2), and the percentage of PD-1+Tim3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells were detected. CD8<sup>+</sup>T cells were transfected with exosomes and/or miR-22-3p mimics to detect the protein level of PD-1. **Results** The expression of LINC01137 in tumor tissues of patients with NSCLC was increased compared with paracancerous tissues ( $3.357 \pm 0.548$  vs  $1.011 \pm 0.371$ ), while the expression of LINC01137 in peripheral blood of patients with NSCLC was increased compared with healthy volunteers ( $3.216 \pm 0.342$  vs  $1.007 \pm 0.313$ ), with statistically significant differences ( $t=-17.367, -17.147$ , all  $P<0.001$ ). There was a positive correlation between the expression of LINC01137 in tumor tissue and peripheral blood ( $r=0.755, P<0.05$ ). LINC01137 was significantly enriched in exosomes derived from A549 cells. Compared with Exo+sh-NC group, the cell viability ( $65.85\% \pm 4.71\%$  vs  $100.15\% \pm 11.93\%$ ) and cell invasion ( $21.46\% \pm 3.48\%$  vs  $43.12\% \pm 1.44\%$ ) in Exo+sh-LINC01137 group were decreased, and the differences were statistically significant ( $t=4.630, 9.953$ , all  $P<0.01$ ). The expression of LINC01137 in peripheral blood of NSCLC patients was negatively correlated with the percentage of CD8<sup>+</sup>T cells ( $r=-0.520, P<0.05$ ). Compared with Exo+sh-NC group, the IFN- $\gamma$  ( $3\ 865.31 \pm 543.85$  pg/ml vs  $1\ 786 \pm 105.98$  pg/ml), TNF- $\alpha$  ( $4\ 631.93 \pm 510.71$  pg/ml vs  $1\ 973.24 \pm 379.62$  pg/ml), Granzyme B ( $3\ 876.49 \pm 312.43$  pg/ml vs  $1\ 879.43 \pm 287.58$  pg/ml), and IL-2 mRNA levels ( $3.286 \pm 0.437$  vs  $1.015 \pm 0.314$ ) were increased, and the percentage of PD-1+Tim3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells ( $7.68\% \pm 2.18\%$  vs  $18.95\% \pm 3.21\%$ ) was decreased in Exo+sh-LINC01137 group, with statistical significances ( $t=-6.497, -7.237, -8.146, -7.310, 5.021$ , all  $P<0.01$ ). Our results showed that miR-22-3p was the target gene of LINC01137. Compared with Exo+NC mimic group, the level of PD-1 protein in Exo+miR-22-3p group ( $0.384 \pm 0.087$  vs  $1.003 \pm 0.147$ ) was significantly decreased, and the difference was statistically significant ( $t=6.277, P<0.01$ ). **Conclusion** The expression of LINC01137 was significantly up-regulated in tumor tissues and plasma of NSCLC patients. Exosomes LINC01137 derived NSCLC cell induces CD8<sup>+</sup>T cell exhaustion by targeting miR-22-3p and inhibiting its expression, and thus promoting NSCLC cell immune escape.

**Keywords:** non-small cell lung cancer; LINC01137; exosomes; miR-22-3p; CD8<sup>+</sup>T cells

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占80%~85%<sup>[1]</sup>,中晚期患者治疗预后较差<sup>[2-3]</sup>。积极探索NSCLC发病分子机制,寻找可靠且有价值的潜在分子诊断标志物,对于临床诊断和治疗至关重要。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)能够通过转录前和转录后调节基因表达,影响肿瘤细胞的生物学功能,在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>。LncRNA LINC01137是近年研究发现的一种LncRNA,研究报道口腔鳞状细胞癌中抑制LINC01137表达后显著抑制了肿瘤进展<sup>[6]</sup>。LINC01137与NSCLC肿瘤免疫浸润密切相关<sup>[7]</sup>,但其具体调节机制尚不清楚。此外越来越多研究表明,外泌体中包含的蛋白质,微小RNA(microRNA, miRNA)和LncRNA可介导细胞间通讯,影响细胞外环境,调节肿瘤的发生和进展<sup>[8-10]</sup>。肿瘤细胞和免疫抑制亚群之间的相互作用能够导致抗肿瘤免疫力耗尽和免疫治疗抵抗<sup>[11]</sup>。故深入了解肿瘤细胞和免疫抑制肿瘤细胞之间的通讯可能会促进癌症免疫治疗的进展。因此,本研究探究了LINC01137对CD8<sup>+</sup>T细胞耗竭和NSCLC细胞免疫逃逸的影响及可能机制,期望为NSCLC免疫治疗靶标的开发提供可靠的参考依据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2020年6月~2022年8月在

西安交通大学第一附属医院接受手术治疗的24例NSCLC患者作为病例组,男性14例,女性10例,年龄45~79( $62.192 \pm 12.034$ )岁。纳入标准:所有患者术前未接受过化疗或放疗,均经病理诊断为NSCLC,有明确的组织学依据;可行根治性手术切除。排除标准:①小细胞肺癌;②术前评估存在广泛的淋巴结转移、胸腔转移或远处转移者;③并发其他重要脏器疾病、血液系统及免疫系统疾病;④精神认知障碍者;⑤术前处于急性感染或肺结核活动期;⑥存在其他部位的原发恶性肿瘤;⑦妊娠期或哺乳期妇女。另选取同期体检的健康受试者24例为对照组,男性12例,女性12例,年龄45~76( $60.953 \pm 10.394$ )岁,病例组和对照组基线资料比较差异无统计学意义( $\chi^2/t=0.336, 0.382$ ,均 $P>0.05$ )。本研究经医院伦理委员会批准,并获得所有患者或其家属的知情同意书。人非小细胞肺癌细胞系(A549)购自中国科学院细胞库(中国上海),在含有10 g/dl胎牛血清的DMEM培养液中培养。

1.2 试剂和仪器 DMEM培养液、胎牛血清、青霉素和链霉素(美国Life Technologies公司);细胞转染试剂Lipofectamine 3000<sup>TM</sup>(美国Invitrogen公司);Prime Script RT反转录试剂盒(TaKaRa公司);TRIzol试剂(美国Life Technologies公司);miScript SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒(德国QIAGEN公司);RIPA裂解缓冲液和BCA蛋白测

定试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；Anti-CD63, Anti-CD9, Anti-TSG101, Anti-PD-1, Anti-GAPDH 和羊抗鼠 IgG 抗体（Abcam 公司）；ECL 化学发光试剂盒（美国 Thermo Scientific 公司）；细胞计数试剂盒-8（CCK-8, 日本 Dojindo, Kumamoto 公司）；sh-NC, sh-LINC01137, NC mimic 和 miR-22-3p mimic（中国上海 GeneChem 公司）；MK3 型酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；Multizoom AZ100 型光学生物显微镜[尼康仪器（上海）有限公司]；Centrifuge5804R 型高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；Tanno 5200 型化学发光凝胶成像仪（上海天能科技有限公司）；Spectra-Maxi3x 型多功能酶标仪（美国 MD 公司）。

1.3 方法

1.3.1 标本采集：收集 NSCLC 患者肿瘤组织和邻近癌旁正常组织，-80℃储存备用。采集所有研究对象清晨空腹静脉血 5 ml，3 000 r/min 离心 15 min，分离血清，-20℃保存备用。

1.3.2 外泌体的分离和鉴定：待 A549 细胞达到 80% 汇合时，将培养液更换为无外泌体培养液，48 h 后收集上清液，2 000 r/min 离心 30 min，通过 0.22 μm 无菌过滤器过滤，10 000 r/min 超速离心 70 min，去除残留 RNA，用 PBS 混合物稀释。Western blot 检测外泌体特异性标记物 CD63，CD9 和 TSG101 蛋白表达。

1.3.3 CD8<sup>+</sup>T 细胞分离：根据说明书，采用人 CD8<sup>+</sup>T 细胞分离试剂盒从外周血中分离纯化 CD8<sup>+</sup>T 细胞，在 37℃含有 5ml/dl CO<sub>2</sub> 的潮湿培养箱中进行培养。

1.3.4 细胞转染 分别用 Exo, Exo+sh-NC 和 Exo+sh-LINC01137 转染 A549 细胞，用 Exo, Exo+NC mimic 和 Exo+miR-22-3p mimic 转染 CD8<sup>+</sup>T 细胞，48 h 后收集细胞进行转染效率检测。

1.3.5 条件培养液制备：待转染后的 A549 细胞达到 70% 汇合时，加入 10 ml 不含胎牛血清的培养液培养 48 h，收集细胞悬液以 400 r/min 离心 10 min

以去除细胞，将上清液 5 000 r/min 离心 20 min 去除细胞碎片，收集上清液作为条件培养液，培养 CD8<sup>+</sup>T 细胞 24 h，收集细胞检测细胞耗竭标志物。

1.3.6 CCK-8 法检测细胞增殖能力：收集各组细胞，调整浓度为 2 × 10<sup>3</sup> 个 /ml，接种至 96 孔板，37℃含有 5ml/dl CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 48 h，加入 10 μl 的 CCK-8 培养液培养 2 h，酶标仪检测各孔细胞 450 nm 处吸光度值（A 值）。细胞存活率 = A<sub>处理组细胞</sub> / A<sub>对照组细胞</sub> × 100%。

1.3.7 Transwell 检测细胞侵袭能力：收集各组细胞，调整浓度为 1 × 10<sup>5</sup> 个 /ml，添加至 Transwell 小室的上室，下室加入 500 μl 含 10 g/dl 胎牛血清的 DMEM 培养液，孵育 24 h，去除下室中含有迁移或侵袭细胞的培养液，并在倒置光学显微镜下检测细胞数量。

1.3.8 流式细胞术分析免疫细胞数量：使用 Countess 自动细胞计数器计数细胞。先对样本进行淋巴细胞的表面标记物染色后行细胞内染色。根据说明书使用异藻蓝蛋白（Allophycocyanin, APC）抗小鼠 CD8a，亮紫 605 抗小鼠 Tim3，PE/Dazzle 594 抗小鼠 CD279（PD-1）抗体进行标记。LIVE/DEAD 蓝固定细胞染色试剂盒用作活性染料，在同种型对照上评估非特异性结合水平。

1.3.9 双荧光素酶报告基因测定：使用 Starbase 数据库检索 LINC01137 的下游靶点基因 miR-22-3p，构建包含 miR-22-3p 结合位点的野生型或突变型 LINC01137 荧光素酶报告质粒，并分别与 miR-22-3p 模拟物和 NC mimic 共转染到 A549 细胞中，根据说明书在转染后 48 h 测量荧光值。

1.3.10 RT-qPCR 分析：使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA，使用 Prime Script RT 试剂盒进行逆转录为 cDNA，以此为模板配置 PCR 反应体系，进行实时 PCR 分析，条件 95℃ 1min，95℃ 20s，56℃ 10s 和 72℃ 15s，30 个循环。引物序列见表 1，以 U6 和 GAPDH 作为内参，通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算相对表达水平。

表 1 RT-qPCR 引物序列		
基因	Forward primer	Reverse primer
LINC01137	5'-CAATGACTCGGCGGAATGTG-3'	5'-ACCCAGGAGTGAGTGAAGCT-3'
IL-2	5'-CACCTGCTCTAAACAACCTCCTATC-3'	5'-ACACAGCATATTATAGACAATAATA-3'
GAPDH	5'-GAGTCAACGGATTGGTCGT-3'	5'-AATGAAGGGGTCATTGATCG-3'
miR-22-3p	5'-GCCAAGCTGCCAGTTGAAG-3'	5'-AGTGCAGGCTCCGAGGTATT-3'
U6	5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'	5'-TTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3'

1.3.11 Western blot 分析：用 RIPA 裂解液提取细胞和组织中的总蛋白，通过 BCA 试剂盒检测蛋白浓度，取 20 μg 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯

酰胺凝胶电泳，后转移到 PVDF 膜上，含 5 g/dl 脱脂奶粉封闭 2 h，分别加入 Anti-CD63（1:1 000），Anti-CD9（1:1 000），Anti-TSG101（1:1 000），



Anti-PD-1 (1:1 000)和 Anti-GAPDH (1:1 000)一抗, 4℃孵育过夜, 次日加入抗鼠 IgG 二抗 (1:1 000), 室温孵育 2 h。使用 ECL 试剂盒检测蛋白信号, Bio-Rad 软件检查蛋白条带的灰度值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 所有实验重复三次, 数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组之间差异性分析采用独立样本 *t* 检验, 多组之间差异性分析采用单因素方差分析; NSCLC 肿瘤组织和邻近癌旁正常组织差异比较采用配对 *t* 检验; 相关性分析采用 Pearson 相关检验。 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 NSCLC 组织、外周血及外泌体中 LINC01137 表达比较 NSCLC 患者肿瘤组织的 LINC01137 表达 ( $3.357 \pm 0.548$ ) 明显高于癌旁组织 ( $1.01 \pm 0.371$ ), 外周血中的 LINC01137 表达 ( $3.216 \pm 0.342$ ) 明显高于健康志愿者外周血 ( $1.007 \pm 0.313$ ), 差异具有统计学意义 (*t* = -17.367, -17.147, 均 *P* < 0.001), 且肿瘤组织和外周血中 LINC01137 表达水平呈正相关 (*r* = 0.755, *P* < 0.05)。Western blot 检测显示, 外泌体中显著表达 CD63, CD9 和 TSG101 等标志蛋白

表 2 干扰 LINC01137 对 NSCLC 细胞增殖、侵袭的影响 [ $(\bar{x} \pm s)$  %]

项 目	Exo		<i>t</i>	<i>P</i>
	sh-NC	sh-LINC0137		
细胞增殖活力	100.153 ± 11.934	65.852 ± 4.715	4.630	<0.01
细胞侵袭率	43.126 ± 1.447	21.464 ± 3.481	9.953	<0.001

2.3 LINC01137 表达与 CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比的相关性 见表 3。NSCLC 患者外周血中 LINC01137 表达水平与 CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比呈负相关 (*r* = -0.520, *P* < 0.05)。

2.4 干扰 LINC01137 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭标志物的

表 3 干扰 LINC01137 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭标志物的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	Exo		<i>t</i>	<i>P</i>
	sh-NC	sh-LINC0137		
IFN-γ (pg/ml)	1 786.971 ± 105.982	3 865.314 ± 543.852	-6.497	<0.01
TNF-α (pg/ml)	1 973.242 ± 379.623	4 631.930 ± 510.715	-7.237	<0.01
Granzyme B (pg/ml)	1 879.439 ± 287.584	3 876.496 ± 312.438	-8.146	<0.01
IL-2 mRNA	1.015 ± 0.314	3.286 ± 0.437	-7.310	<0.01
PD-1 <sup>+</sup> Tim3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T 细胞 (%)	18.952 ± 3.216	7.680 ± 2.185	5.021	<0.01

2.5 LINC01137 靶向下调 miR-22-3p 表达 通过 Starbase 数据库预测显示, miR-22-3p 与 LINC01137 存在有结合位点, 见图 2。通过荧光素酶报告基因分析验证发现, miR-22-3p mimic 显著降低了 LINC01137 野生型质粒荧光素酶活性, 差异有统计

(图 1), 表明外泌体分离成功。进一步分析发现, 与上清液 ( $1.012 \pm 0.257$ ) 相比, 分离的外泌体中 LINC01137 ( $13.835 \pm 0.712$ ) 显著富集, 差异具有统计学意义 (*t* = -82.989, *P* < 0.001)。

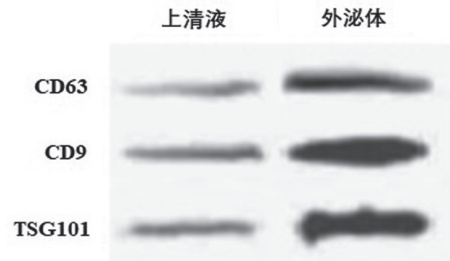


图 1 Western blot 检测外泌体标志蛋白表达

2.2 干扰 LINC01137 对细胞增殖、侵袭的影响 RT-qPCR 检测显示, Exo+sh-LINC01137 组中 LINC01137 表达水平 ( $0.345 \pm 0.132$ ) 显著低于 Exo+sh-NC 组 ( $1.015 \pm 0.316$ ), 差异具有统计学意义 (*t* = -3.389, *P* < 0.01), 提示 sh-LINC01137 干扰细胞系构建成功。细胞实验结果显示, 与 Exo+sh-NC 组相比, Exo+sh-LINC01137 组细胞增殖活力和侵袭能力显著降低, 差异具有统计学意义 (均 *P* < 0.01), 见表 2。

影响 与 Exo+sh-NC 组相比, Exo+sh-LINC01137 组 IFN-γ, TNF-α, Granzyme B 含量和 IL-2 mRNA 水平升高, PD-1<sup>+</sup>Tim3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比降低, 差异具有统计学意义 (均 *P* < 0.01)。

学意义 (*t* = 9.703, *P* < 0.001), 而对 LINC01137 突变型质粒荧光素酶活性无明显影响, 差异无统计学意义 (*t* = 0.260, *P* > 0.05), 见表 4。以上结果提示 miR-22-3p 作为 LINC01137 的下游靶标, 表达水平受 LINC01137 负调控。

LINC01137 Mutant 3' UTR 5' ... ACCTTTTGCATGATGAGCGCGACG...  
LINC01137 Wild-type 3' UTR 5' ...ACCTTTTGCATGATGAGCGAGCTG...  
hsa-miR-22-3p 3' TGCAAGAAAGTTGACCGTCGTCGAA

图2 miR-22-3p与LINC01137的结合位点

表4 miR-22-3p与LINC0113靶向结合关系验证( $\bar{x} \pm s$ )

项目	NC mimic 组	miR-22-3p mimic 组	t	P
LINC01137-WT	1.005 ± 0.086	0.456 ± 0.047	9.703	< 0.001
LINC01137-Mut	1.007 ± 0.043	0.997 ± 0.051	0.260	0.808

2.6 过表达 miR-22-3p 对 PD-1 蛋白表达的影响 Western blot 检测显示,与 Exo+NC mimic 组相比,Exo+miR-22-3p 组免疫识别蛋白 PD-1 表达水平显著降低( $1.003 \pm 0.147$  vs  $0.384 \pm 0.087$ ),差异具有统计学意义( $t=6.277$ ,  $P < 0.01$ ),以上结果提示过表达 miR-22-3p 可抑制 NSCLC 细胞免疫逃逸。

### 3 讨论

近年随着高通量技术的发展,越来越多的 LncRNAs 被发现,其生物学功能参与包括 X 染色体失活、充当核亚结构的骨架、调节 mRNA 降解和调节染色质重塑等过程<sup>[12-13]</sup>。以宿主免疫反应为中心的免疫疗法在 NSCLC 治疗方面具有广阔的前景,不幸的是 NSCLC 的肿瘤微环境使得肿瘤在免疫治疗期间能够避免免疫攻击<sup>[14]</sup>。目前 LncRNA 已被证明在癌症免疫调节中发挥重要作用,并可作为免疫治疗靶点。

研究表明,多种 LncRNA 可调节肺癌的生物学过程,是潜在的 NSCLC 免疫治疗靶点,例如,叉头框 C1 (FOXC1) 介导的 LncRNA LINC00301 通过调节低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF1 $\alpha$ ) 通路促进 NSCLC 的肿瘤进展并触发免疫抑制微环境<sup>[15]</sup>。LncRNA PCAT1 表达增加与 NSCLC 免疫细胞浸润呈负相关,其通过抑制环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶 (cyclicGMP-AMP synthase, cGAS) / 干扰素基因刺激蛋白 (interferon genes stimulating protein, STING) 信号介导的 T 细胞激活,促进肿瘤发生和免疫抑制<sup>[16]</sup>。LncRNA SNHG12 通过与人抗原 R (human antigen R, HuR) 结合并增加程序性细胞死亡受体配体 1 (programmed cell death receptor ligand 1, PD-L1) 和泛素特异性蛋白酶 8 (ubiquitin-specific protease 8, USP8) 表达,促进了 NSCLC 的免疫逃逸<sup>[17]</sup>。近年 LINC01137 被报道与肿瘤免疫敏感性相关,生物信息学分析发现肺腺癌相关免疫敏感性治疗中 LINC01137 差异表达<sup>[18]</sup>。对 TCGA 数据库中 535 例肺腺癌和 502 例肺鳞状细胞癌患者的数据分析发现, LINC01137 与患者不同的肿瘤免疫细胞浸润相关,高 LINC01137 表达患者预后不良<sup>[7]</sup>。LINC01137 是肺癌预后和免疫治疗

的预测标志物<sup>[19]</sup>,本研究中发现, NSCLC 组织及外周血中 LINC01137 均表达上调,沉默其表达后抑制了细胞的增殖和侵袭,而过表达 LINC01137 则可诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭。目前关于 LINC01137 作用机制的研究报道显示, LINC01137 通过海绵化含 WW 结构域的氧化还原酶 (WW domain-containing oxidoreductase, WWOX) 靶向 miR-186-5p 促进膀胱癌进展,作为一个癌基因在膀胱癌中发挥作用<sup>[20]</sup>。原发性口腔鳞状细胞癌中 LINC01137 表达显著上调,敲低其表达抑制了细胞增殖、迁移和侵袭, LINC01137 过表达通过靶向抑制 miR-22-3p 促进了细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[6]</sup>。以上报道与本研究结果相一致,提示 LINC01137 可能作为一个癌基因在 NSCLC 进展中发挥作用。

相关研究表明,外泌体与癌症的发生和进展密切相关,肿瘤细胞来源的外泌体被证实通过传递特定的 RNA,包括 LncRNA,可影响受体细胞的功能,参与肿瘤的发生、发展、转移和耐药性<sup>[9, 21-22]</sup>。例如,肿瘤源性外泌体 LncRNA-SOX2OT 通过靶向破骨细胞中的 miRNA-194-5p/Ras 相关 C3 肉毒素底物 1 (Ras related C3 botulinum toxin substrate 1, RAC1) 信号轴,促进 NSCLC 骨转移<sup>[23]</sup>。外泌体 LncRNA LINC00662 通过调节 miR-320d/E2F 转录因子 1 (E2F transcription factor 1, E2F1) 轴促进 NSCLC 进展<sup>[24]</sup>。最新研究发现,肿瘤和免疫细胞之间通过外泌体进行的串扰也会引起肿瘤微环境免疫状态的重新编程,导致肿瘤免疫逃逸和对免疫治疗的抵抗<sup>[11]</sup>。GAO 等研究<sup>[25]</sup>也发现,外泌体 circZNF451 通过脆性 X 染色体相关基因 1 (fragile X-related 1, FXR1) / E74 样受体 4 (E74-like receptor 4, ELF4) / 干扰素调节因子 4 (interferon regulatory factor 4, IRF4) 轴诱导巨噬细胞极化来重塑肿瘤免疫微环境,抑制肺腺癌的抗 PD-1 治疗。M1 巨噬细胞外泌体靶向白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4) 受体促进 M1 极化,并通过将肿瘤相关巨噬细胞重编程为 M1 样巨噬细胞来抑制肿瘤生长<sup>[26]</sup>。本研究发现, NSCLC 细胞来源的外泌体中 LINC01137 显著富集,并且转染外泌体显著促进了细胞的增殖和侵袭,沉默 LINC01137 则得到相反的结果,提示 LINC01137 被外泌体包裹,可能被输送到肿瘤微环境中调节肿瘤免疫反应,促进 NSCLC 的肿瘤进展。

在肿瘤微环境中,外泌体可以在肿瘤细胞、免疫细胞和基质细胞之间转移生物活性分子,以帮助癌细胞避免免疫监测和诱导免疫耐受<sup>[22]</sup>。T 细胞是免疫反应的主要成分,可引起持续的免疫反应, T 细胞衰竭是癌症的特征之一<sup>[27]</sup>。有报道显

示,多种癌症患者的预后受CD8<sup>+</sup>T细胞活性影响,CD8<sup>+</sup>T细胞耗竭促进肿瘤进展<sup>[28]</sup>。在T细胞耗竭过程中,T细胞经历独特的细胞和分子过程,表现出效应器功能丧失、代谢惰性、自我更新能力减弱和干性丧失以及表观遗传和转录重编程。免疫检查点抑制受体[例如PD-1,细胞毒性T细胞相关蛋白-4(Cytotoxic T lymphocyte associate protein-4,CTLA-4)]的上调明显发生在T细胞耗竭过程中<sup>[29]</sup>。本研究中,NSCLC外周血LINC01137高表达与CD8<sup>+</sup>T细胞百分比呈负相关,沉默LINC01137促进了CD8<sup>+</sup>T细胞耗竭标志物的表达,减少CD8<sup>+</sup>T细胞耗竭表型PD-1+Tim3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞百分比。研究进一步通过Starbase在线数据库检索并证实miR-22-3p是LINC01137的潜在miRNA靶标,推断LINC01137在NSCLC中的调节作用可能通过靶向抑制miR-22-3p来实现。miRNA常被用作疾病诊断标志,据报道显示血浆外泌体Let-7b-5p,miR-184和miR-22-3p水平可以用于NSCLC诊断和耐药预测<sup>[30]</sup>。miR-22-3p被发现在NSCLC中表达显著下调,LncRNA NNT-AS1通过调控miR-22-3p/Yes相关蛋白(Yes-associated protein 1,YAP1)轴促进NSCLC进展<sup>[31]</sup>。本研究发现,过表达miR-22-3p显著抑制免疫识别蛋白PD-1表达。现有报道表明PD-1高表达的CD8<sup>+</sup>T细胞的富集与癌症患者较差的临床结果相关,因此揭示T细胞耗竭状态可用于将免疫检查点阻断纳入辅助治疗策略<sup>[32]</sup>。本研究结果表明,miR-22-3p是NSCLC的潜在抑癌基因,通过抑制PD-1的表达阻断NSCLC细胞的免疫逃逸,抑制肿瘤进展。

综上所述,NSCLC组织及外周血中LINC01137表达显著上调,NSCLC来源的外泌体LINC01137通过靶向CD8<sup>+</sup>T细胞中miR-22-3p抑制其表达,诱导CD8<sup>+</sup>T细胞耗竭,促进NSCLC细胞免疫逃逸,导致肿瘤进展。

#### 参考文献:

- [1] ALDUAIS Y, ZHANG Haijun, FAN Fan, et al. Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment[J]. *Medicine*, 2023, 102(8): e32899.
- [2] REMON J, HENDRIKS L E L, MOUNTZIOS G, et al. MET alterations in NSCLC-current perspectives and future challenges[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2023, 18(4): 419-435.
- [3] TSAMIS I, GOMATOU G, CHACHALI S P, et al. BRAF/MEK inhibition in NSCLC: mechanisms of resistance and how to overcome it[J]. *Clinical & Translational Oncology*, 2023, 25(1): 10-20.
- [4] HU Chengyu. LncRNA DSCAM-AS1: A pivotal therapeutic target in cancer[J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2023, 23(5): 530-536.
- [5] 周立远,叶玉祥,林琳,等. LncRNA CCAT1 调节 miR-155 表达增强 CD8<sup>+</sup>T 细胞对食管癌抗肿瘤活性的机制研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(3): 79-85.  
ZHOU Liyuan, YE Yuxiang, LIN Lin, et al. Mechanism of LncRNA CCAT1 regulating miR-155 expression and enhancing anti-tumor activity of CD8<sup>+</sup>T cells against esophageal cancer[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(3): 79-85.
- [6] DU Yong, YANG Haiyan, LI Yue, et al. Long non-coding RNA LINC01137 contributes to oral squamous cell carcinoma development and is negatively regulated by miR-22-3p[J]. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 2021, 44(3): 595-609.
- [7] YAO Yuanshan, YANG Fuzhi, CHEN Anna, et al. Costimulatory molecule-related LncRNA model as a potential prognostic biomarker in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Medicine*, 2023, 12(5): 6419-6436.
- [8] ZHANG Lili, MAO Bin, ZHAO Xiaodong, et al. Translation regulatory long non-coding RNA 1 (TRERNA1) sponges microRNA-23a to suppress granulosa cell apoptosis in premature ovarian failure[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 2173-2180.
- [9] 靳杨,姜利琼,房烨,等. 结直肠癌患者血清外泌体与组织中 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变检测及临床意义的比较[J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(1): 22-26.  
JIN Yang, JIANG Liqiong, FANG Ye, et al. Comparison of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA gene mutations in serum exosomes and tissues of patients with colorectal cancer and their clinical significance[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(1): 22-26.
- [10] ENTEZARI M, GHANBARIRAD M, TAHERIA-ZAM A, et al. Long non-coding RNAs and exosomal LncRNAs: Potential functions in lung cancer progression, drug resistance and tumor microenvironment remodeling[J]. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2022, 150: 112963.
- [11] ZHAO Yarong, LIU Luotong, SUN Rongze, et al. Exosomes in cancer immunoediting and immunotherapy[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2022, 17(2): 193-205.
- [12] ADNANE S, MARINO A, LEUCCI E. LncRNAs in human cancers: signal from noise[J]. *Trends in Cell Biology*, 2022, 32(7): 565-573.
- [13] HERMAN A B, TSITSIPATIS D, GOROSPE M. Integrated LncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(12): 2252-2266.
- [14] RECK M, REMON J, HELLMANN M D. First-Line immunotherapy for non-small-cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2022, 40(6): 586-597.
- [15] SUN Chengcao, ZHU Wei, LI Shujun, et al. FOXC1-mediated LINC00301 facilitates tumor progression and triggers an immune-suppressing microenvironment in non-small cell lung cancer by regulating the HIF1  $\alpha$  pathway[J]. *Genome Medicine*, 2020, 12(1): 77.

(下转第134页)



- Expression analysis of miR-211-5p in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2022, 34(5): 5-8.
- [19] 李男, 高关羽, 聂桐. 木犀草苷通过调控 miR-211 表达对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞损伤的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(5): 839-844.
- LI Nan, GAO Guanyu, NIE Tong. Effects of luteolin on oxygen-glucose deprivation induced cortical nerve cell damage in rats by regulating miR-211 expression[J]. Chinese Pharmacist, 2021, 24(5): 839-844.
- [20] LI Bing, HUANG Zhi, MENG Ju, et al. MiR-202-5p attenuates neurological deficits and neuronal injury in MCAO model rats and OGD-induced injury in Neuro-2a cells by targeting eIF4E-mediated induction of autophagy and inhibition of Akt/GSK-3 $\beta$  pathway[J]. Molecular and Cellular Probes, 2020, 51: 101497.
- [21] DONG Lihua, SUN Lei, ZHANG Wenjing, et al. Reduced serum miR-202 may promote the progression of Alzheimer's disease patients via targeting amyloid precursor protein[J]. Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2021, 37(8): 730-738.
- [22] XIN Cuiyu, XIA Jiejing, LIU Yulan, et al. MicroRNA-202-3p targets brain-derived neurotrophic factor and is involved in depression-like behaviors[J]. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2020, 16: 1073-1083.
- 收稿日期: 2023-05-23  
修回日期: 2023-11-10
- 
- (上接第6页)
- [16] GAO Yanping, ZHANG Nannan, ZENG Zihang, et al. LncRNA PCAT1 activates SOX2 and suppresses radioimmune responses via regulating cGAS/STING signalling in non-small cell lung cancer[J]. Clinical and Translational Medicine, 2022, 12(4): e792.
- [17] HUANG Yusheng, XIA Lei, TAN Xiangwu, et al. Molecular mechanism of LncRNA SNHG12 in immune escape of non-small cell lung cancer through the HuR/PD-L1/USP8 axis[J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2022, 27(1): 43.
- [18] ZHUANG Jinman, CHEN Zhongwu, CHEN Zishan, et al. Construction of an immune-related LncRNA signature pair for predicting oncologic outcomes and the sensitivity of immunosuppressor in treatment of lung adenocarcinoma[J]. Respiratory Research, 2022, 23(1): 123.
- [19] WANG Xinyi, JING Hui, LI Hecheng. A novel cuproptosis-related LncRNA signature to predict prognosis and immune landscape of lung adenocarcinoma[J]. Translational Lung Cancer Research, 2023, 12(2): 230-246.
- [20] KOŁAT D, KAŁUZIŃSKA-KOŁAT Ź, KOŚLA K, et al. LINC01137/miR-186-5p/WWOX: a novel axis identified from WWOX-related RNA interactome in bladder cancer[J]. Frontiers in Genetics, 2023, 14: 1214968.
- [21] ZHU Le, SUN Haoting, WANG Shun, et al. Isolation and characterization of exosomes for cancer research[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2020, 13(1): 152.
- [22] HE Jiao, REN Weihong, WANG Wei, et al. Exosomal targeting and its potential clinical application[J]. Drug Delivery and Translational Research, 2022, 12(10): 2385-2402.
- [23] NI Jianjiao, ZHANG Xiaofei, LI Juan, et al. Tumour-derived exosomal LncRNA-SOX2OT promotes bone metastasis of non-small cell lung cancer by targeting the miRNA-194-5p/RAC1 signalling axis in osteoclasts[J]. Cell Death & Disease, 2021, 12(7): 662.
- [24] LÜ Xin, LIAN Yingjie, LIU Zhanye, et al. Exosomal long non-coding RNA LINC00662 promotes non-small cell lung cancer progression by miR-320d/E2F1 axis[J]. Aging, 2021, 13(4): 6010-6024.
- [25] GAO Jian, AO Yongqiang, ZHANG Lingxian, et al. Exosomal circZNF451 restrains anti-PD1 treatment in lung adenocarcinoma via polarizing macrophages by complexing with TRIM56 and FXR1[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2022, 41(1): 295.
- [26] GUNASSEKARAN G R, POONGKAVITHAI VADEVOO S M, BAEK M C, et al. M1 macrophage exosomes engineered to foster M1 polarization and target the IL-4 receptor inhibit tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages into M1-like macrophages[J]. Biomaterials, 2021, 278: 121137.
- [27] DOLINA J S, VAN BRAECKEL-BUDIMIR N, THOMAS G D, et al. CD8<sup>+</sup> T Cell exhaustion in cancer [J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 715234.
- [28] VAN D L A M, THOMMEN D S, SCHUMACHER T N. CD8<sup>+</sup> T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis[J]. Nature Reviews Cancer, 2020, 20(4): 218-232.
- [29] KIM C G, KIM G, KIM K H, et al. Distinct exhaustion features of T lymphocytes shape the tumor-immune microenvironment with therapeutic implication in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2021, 9(12): e002780.
- [30] VADLA G P, DAGHAT B, PATTERSON N, et al. Combining plasma extracellular vesicle Let-7b-5p, miR-184 and circulating miR-22-3p levels for NSCLC diagnosis and drug resistance prediction[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 6693.
- [31] HE Wenlong, ZHANG Yeying, XIA Shulan. LncRNA NNT-AS1 promotes non-small cell lung cancer progression through regulating miR-22-3p/YAP1 axis[J]. Thoracic Cancer, 2020, 11(3): 549-560.
- [32] SHENG Jin, WANG Huadi, LIU Xiao, et al. Deep sequencing of T-Cell receptors for monitoring peripheral CD8<sup>+</sup> T cells in Chinese advanced non-small-cell lung cancer patients treated with the anti-PD-L1 antibody[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021, 8: 679130.
- 收稿日期: 2023-06-07  
修回日期: 2023-11-13