miR-140-3p.2靶向PD-L1表达增强CD8$^+$ T细胞对肝癌细胞的杀伤作用

张博洋[1]，苏荣荣[2]
1. 北京大学医学部 基础医学院，北京 100191
2. 北京明日达科技发展有限责任公司，北京 100095

摘 要：目的 探究miR-140-3p.2靶向程序性死亡受体配体1（PD-L1）表达对细胞毒性T细胞（CD8$^+$ T细胞）杀伤肝癌细胞的影响。**方法** 实时荧光定量PCR（qRT-PCR）、Western blotting检测L-02和HepG2、Hep3B、HuH-7细胞系中*miR-140-3p.2*和PD-L1 mRNA和蛋白水平；Targetscan数据库预测miR-140-3p.2和PD-L1的结合位点，并利用双荧光素酶实验进行验证；HepG2细胞分为过表达miR-140-3p.2（miR-140-3p.2）组及其对照（miR-NC）组、过表达PD-L1（PD-L1）组及其对照（NC）组、过表达miR-140-3p.2和PD-L1（miR-140-3p.2＋PD-L1）组、过表达miR-140-3p.2和PD-L1对照（miR-140-3p.2＋NC）组；qRT-PCR、Western blotting实验分别检测各组细胞中*miR-140-3p.2*和PD-L1 mRNA和蛋白水平。30只裸鼠分为过表达miR-140-3p.2（miR-140-3p.2）组及其对照（miR-NC）组，每组各15只，采用sc过表达miR-140-3p.2及其对照（miR-NC）的HepG2细胞制备移植瘤模型；检测肿瘤质量及体积；分离裸鼠脾脏组织CD8$^+$ T细胞，并与各转染HepG2细胞共培养，细胞毒性实验检测细胞裂解率，ELISA法检测细胞培养上清液中肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、γ干扰素（IFN-γ）水平；ELISA法检测移植瘤中TNF-α、IFN-γ水平，流式细胞术检测移植瘤中CD8$^+$ T细胞浸润情况。**结果** 与L-02细胞相比，HepG2、Hep3B、HuH-7细胞中*miR-140-3p.2*水平降低，PD-L1 mRNA和蛋白水平升高（P＜0.05）。与miR-NC组相比，miR-140-3p.2组细胞中*miR-140-3p.2*水平升高，PD-L1 mRNA和蛋白水平降低，细胞裂解率升高，细胞培养上清液中TNF-α、IFN-γ水平升高（P＜0.05）；与NC组相比，PD-L1组细胞中*miR-140-3p.2*水平降低，PD-L1 mRNA和蛋白水平升高，细胞裂解率降低，细胞培养上清液中TNF-α、IFN-γ水平降低（P＜0.05）；过表达PD-L1能部分逆转过表达miR-140-3p.2对上述指标的影响（P＜0.05）。裸鼠成瘤4周后，与miR-NC组相比，miR-140-3p.2组移植瘤体积和质量明显减小（P＜0.05），移植瘤中*miR-140-3p.2*水平明显升高、PD-L1 mRNA和蛋白水平明显降低（P＜0.05），CD8$^+$ T细胞浸润水平明显升高（P＜0.05），TNF-α、IFN-γ水平明显升高（P＜0.05）。**结论** miR-140-3p.2靶向PD-L1表达增强CD8$^+$ T细胞对肝癌细胞的杀伤作用。

关键词： miR-140-3p.2；程序性死亡受体配体1；CD8$^+$ T细胞；肝癌；肿瘤坏死因子-α；γ干扰素
中图分类号： R735.7 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2024）10-2309-08
DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.10.010

MiR-140-3p.2 enhances killing effect of CD8$^+$ T cells on liver cancer cells by targeting PD-L1 expression

ZHANG Boyang[1], SU Rongrong[2]
1. School of Basic Medicine, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China
2. Beijing Tomorrowda Technology Development Co., Ltd., Beijing 100095, China

Abstract: Objective To explore the effect of miR-140-3p.2 on cytotoxic T cells (CD8$^+$ T cells) killing liver cancer cells by targeting programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression. **Methods** QRT-PCR and Western blotting were used to detect *miR-140-3p.2*, *PD-L1* mRNA and protein levels in L-02, HepG2, Hep3B, and HuH-7 cell lines. Targetscan database was used to predict the binding sites of miR-140-3p.2 and PD-L1, and validated using dual luciferase assay. HepG2 cells were divided into overexpressing of miR-140-3p.2 (miR-140-3p. 2) group and its control (miR-NC) group, overexpressing of PD-L1 (PD-L1) group and its control (NC) group, overexpressing of miR-140-3p. 2+PD-L1 (miR-140-3p. 2+PD-L1) group and its control (miR-140-3p. 2+NC) group. QRT-PCR and Western blotting were used to detect *miR-140-3p.2,* PD-L1 mRNA and protein levels in cells. Thirty nude mice were divided into overexpression of miR-140-3p. 2 (miR-140-3p. 2) group and control (miR-NC) group, with 15 mice in each group. Subcutaneous

收稿日期： 2024-05-07
第一作者： 张博洋，研究方向为基础医学。E-mail：boyang888@163cn.com.cn

injection of HepG2 cells was used to prepare transplanted tumor model. $CD8^+$ T cells from nude mouse spleen tissue was isolated and cocultured with HepG2 cells. Cytotoxicity experiment was used to detect cell lysis rate; ELISA was used to detect TNF-α, IFN-γ levels in cell culture supernatant and transplanted tumors; Flow cytometry was used to detect $CD8^+$ T cell infiltration in transplanted tumors. **Results** Compared with L-02 cells, *miR-140-3p.2* levels in HepG2, Hep3B, and HuH-7 cells were decreased , while PD-L1 mRNA and protein levels were increased ($P < 0.05$); Compared with miR-NC group, *miR-140-3p.2* level in miR-140-3p.2 group was increased, PD-L1 mRNA and protein levels were decreased, Cell lysis rate was increased, TNF-α, IFN-γ levels in cell culture supernatant were increased ($P < 0.05$); Compared with NC group, *miR-140-3p.2* level in PD-L1 group was decreased, PD-L1 mRNA and protein levels were inicreased, cell lysis rate was decreased, TNF-α, IFN-γ levels in cell culture supernatant were decreased ($P < 0.05$); Overexpression of PD-L1 could partially reverse the effect of overexpression of miR-140-3p.2 on the above indicators ($P < 0.05$). Overexpression of miR-140-3p.2 could enhance the killing ability of $CD8^+$ T cells against liver cancer cells in vivo ($P < 0.05$). After four weeks of tumor formation in nude mice, the tumor volume and mass in miR-140-3p.2 group were significantly decreased compared with that in miR-NC group ($P < 0.05$), the level of miR-140-3p.2 in transplanted tumors was significantly increased, and the mRNA and protein levels of PD-L1 were significantly decreased ($P < 0.05$). $CD8^+$ T cell infiltration level was significantly increased ($P < 0.05$), TNF-α, IFN-γ levels were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-140-3p.2 enhances the killing effect of $CD8^+$ T cells on liver cancer cells by targeting PD-L1 expression.

Key words: miR-140-3p.2; programmed death-ligand 1; $CD8^+$ T cell; liver cancer; tumor necrosis factor-α; interferon-γ

肝癌是第3大常见的消化系统恶性肿瘤（仅次于胃癌和食道癌），好发于中年男性人群中[1]。据统计，我国每年肝癌死亡病例约11万例，占世界肝癌总死亡病例的45%[2]。肝癌发病隐匿，早期症状不明显，多数患者在常规肝病检查或体检中偶然发现患癌，而一旦出现肝区疼痛、体力下降、体质量减轻、黄疸及腹水等症状时，病情往往已发展至中晚期[3]。目前，临床常采用手术、放/化疗、肝移植和免疫治疗等方式治疗肝癌。不同于传统治疗手段，免疫治疗致力于激活患者免疫系统，依靠其自身免疫机能对抗癌细胞[4]。程序性死亡受体1（PD-1，也称CD279）/程序性死亡受体配体1（PD-L1，也称CD274）抑制剂是近年来肿瘤免疫疗法的研究热点[5]。PD-L1作为肿瘤细胞表面的免疫抑制因子，其通过与T细胞表面的PD-1结合，使得T细胞将肿瘤细胞识别为正常细胞，从而实现免疫逃逸[6]。已有研究显示，降低肝癌细胞中PD-L1的表达水平能显著增强细胞毒性T细胞（$CD8^+$ T细胞）对癌细胞的杀伤作用，并已取得良好的临床治疗效果[7-8]。因此，深入探讨调控$CD8^+$ T细胞对肿瘤杀伤作用的相关机制，有望为肿瘤免疫治疗提供新的靶点。

微小RNA（microRNA，miRNA）是一类内源性非编码RNA，长度约为22个核苷酸，对转录后基因表达具有调控作用，在细胞生物学过程中扮演重要角色[9]。课题组前期对肝癌细胞中的miRNA测序发现，包括miR-140-3p.2在内的多种miRNA表达显著变化。另外，已有研究报道，miR-140-3p在肝癌中呈现低表达，过表达miR-140-3p能够抑制肝癌细胞增殖和体内肿瘤生长[10-11]。此外，miR-140-3p可通过靶向PD-L1表达抑制多种类型癌症进展，包括鼻咽癌[12]、结直肠癌[13]、弥漫大B细胞淋巴瘤[14]等。然而，关于miR-140-3p.2是否影响肝癌中$CD8^+$ T细胞的杀伤能力，目前尚无研究报道。基于此，本研究旨在探究miR-140-3p.2靶向PD-L1表达对$CD8^+$ T细胞杀伤肝癌细胞的增强作用，以期为肝癌中的免疫治疗提供借鉴。

1 材料

1.1 细胞

人肝正常细胞L-02（货号SNL-141）和人肝癌细胞系HepG2、Hep3B、HuH-7（货号分别为SNL-083、SNL-082、SNL-085）均购自武汉尚恩生物技术有限公司。上述细胞接种于含10%胎牛血清、1%青/链霉素的RPMI 1640培养基中，并置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。待细胞融合至80%时进行传代。

1.2 裸鼠

30只8周龄体质量为（20±2）g的SPF级雄性BALB/c裸鼠，购自中研子创（北京）生物科技有限公司，实验动物生产许可证号SCXK（京）2022-0010。裸鼠喂以无菌饲料和水，并饲养于室温（23±2）℃、湿度（60±5）%、明暗交替12 h/12 h的安静环境中，适应性饲养1周后进行实验。相关研究已通过北京大学医学部基础医学院动物实验伦理委员会批准（20220927）。

1.3 主要试剂

细胞培养基（货号SNLM-141）购自武汉尚恩生物技术有限公司；EasySep™ Human $CD8^+$ T Cell Isolation Kit/EasySep™试剂盒（货号17953）购自加拿大STEMCELL公司；鼠源PE-CD8单克隆抗

体（货号ab28017）购自英国Abcam公司；*miR-140-3p.2*、*PD-L1*扩增引物均购自北京擎科生物科技股份有限公司；过表达miR-140-3p.2的腺相关病毒质粒（AAV-miR-140-3p.2）及其对照（AAV-miR-NC）、过表达PD-L1的腺相关病毒质粒（AAV-PD-L1）及其对照（AAV-NC）均购自上海吉玛制药技术有限公司；鼠源PD-L1单克隆抗体（货号bsm-43073M）购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.4 主要仪器

StepOne实时荧光定量PCR（qRT-PCR）仪购自美国Applied Biosystems公司；NanoDropOneC紫外分光光度计、CL21R冷冻台式离心机均购自美国Thermo公司；蛋白电泳仪、转膜仪均购自美国Bio-Rad公司。

2 方法

2.1 qRT-PCR检测

收集L-02、HepG2、Hep3B、HuH-7细胞系，加入Trizol裂解液裂解，离心取上清液，加入氯仿/异丙醇进行RNA抽提，使用75%乙醇洗涤RNA沉淀，加入无酶水溶解RNA，电泳检测RNA质量并进行定量。利用cDNA反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA（37 ℃ 15 min、85 ℃ 5 s）。使用SYBR Green试剂盒进行PCR扩增（95 ℃ 5 min、95 ℃ 20 s、60 ℃ 30 s，35个循环）。分别选择*U6*和*GAPDH*作为内参基因，以校正目的基因的C_t值，根据公式$2^{-\Delta\Delta Ct}$，计算各组细胞中*miR-140-3p.2*、*PD-L1* mRNA相对水平。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列
miR-140-3p.2-F	5’-TCCAACGGCGGTGTCCTTA-3’
miR-140-3p.2-R	5’-CGGGCGTTCCGACCACTA-3’
PD-L1-F	5’-TTCGGGTGTGGGTTTGGGGTTTTA-3’
PD-L1-R	5’-CATAACCAACACCAACCCCACTA-3’
U6-F	5’-CTCGCTTCGGCAGCACA-3’
U6-R	5’-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3’
GAPDH-F	5’-AAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3’
GAPDH-R	5’-GGAAGATGGTGATGGGATTT-3’

2.2 Western blotting检测

收集L-02和HepG2、Hep3B、HuH-7细胞系，加入RIPA裂解液进行匀浆，提取蛋白上清液。利用BCA法对蛋白浓度进行定量。将各组蛋白与等量上样缓冲液混匀，并在沸水浴中变性10 min。同时，配制分离胶和浓缩胶，取10 μL待测样品和蛋白Marker依次上样，并进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）电泳（90 V 30 min、120 V 50 min）。电泳完成后，进行转膜（100 V 90 min）。转膜完成后，将PVDF膜置于5%脱脂牛奶中，室温封闭2 h，经过TBST洗涤后，加入一抗（鼠源PD-L1单克隆抗体，稀释比例为1∶2 000）4 ℃孵育过夜，次日加入二抗（HRP标记山羊源IgG，稀释比例为1∶10 000）室温孵育2 h。TBST洗涤后，加入ECL试剂，进行曝光、显影，计算各组细胞中PD-L1蛋白相对水平。

2.3 生物信息学预测和双荧光素酶实验

Targetscan数据库（https://www.targetscan.org/vert_72/）预测miR-140-3p.2和PD-L1的结合位点，并扩增该片段。将该片段插入psi-CHECK荧光素酶载体，分别构建野生型PD-L1质粒（psi-CHECK-PD-L1-WT）和突变型PD-L1质粒（psi-CHECK-PD-L1-MUT）。将上述质粒分别与miR-140-3p.2模拟物（miR-140-3p.2 mimic）及其对照（mimic NC）混匀，利用Lipofectamine 3 000分别将上述混合物转染至HepG2细胞，转染48 h后，检测各组细胞荧光素酶活性。

2.4 细胞转染

HepG2细胞分为过表达miR-140-3p.2（miR-140-3p.2）组及其对照（miR-NC）组、过表达PD-L1（PD-L1）组及其对照（NC）组、过表达miR-140-3p.2+PD-L1（miR-140-3p.2+PD-L1）组及其对照（miR-140-3p.2+NC）组。HepG2细胞进行常规培养，待细胞融合至70%时，进行细胞转染。根据LipofectamineTM 3 000说明书，将25 μL腺相关病毒质粒（AAV-miR-140-3p.2、AAV-miR-NC、AAV-PD-L1、AAV-NC）溶液（质粒质量为1 μg）和25 μL Lipofectamine 3000混合溶液加入HepG2细胞中。转染4 h后，更换新鲜培养基。各组细胞均培养72 h，随后收集细胞。qRT-PCR、Western blotting实验分别检测各组细胞中*miR-140-3p.2*、PD-L1 mRNA和蛋白水平。

2.5 裸鼠移植瘤模型制作

30只裸鼠分为过表达miR-140-3p.2（miR-140-3p.2）组及其对照（miR-NC）组，每组各15只。通过sc 100 μL过表达miR-140-3p.2及其对照（miR-NC）的HepG2细胞（1×10^7个）构建裸鼠移植瘤模型。每周测量移植瘤体积，当裸鼠体内形成肿瘤，并且肿瘤能够按照一定速度增长，证明模型构建成功。造模4周后，颈椎脱臼处死裸鼠，剥离移植瘤拍照并

称质量。qRT-PCR、Western blotting实验分别检测各组移植瘤中*miR-140-3p.2*、PD-L1 mRNA和蛋白水平。

2.6 $CD8^+$ T细胞分离和鉴定

收集裸鼠脾脏组织，用眼科剪剪碎后，加入胶原酶进行消化，将消化后的组织置于70 μm细胞筛网上，并用注射器活塞轻轻研磨，至脾脏组织完全分散为单细胞，经磷酸盐缓冲液（PBS）溶液冲洗后，收集脾细胞悬液。按照EasySep™ Human $CD8^+$ T Cell Isolation Kit/EasySep™试剂盒负选$CD8^+$ T细胞。步骤如下：脾细胞悬液经350×*g*离心5 min，弃上清，使用含2%胎牛血清、0.02 mol·L^{-1} EDTA的PBS溶液重悬脾细胞悬液（1×10^8·mL^{-1}），随后转入无菌流式管；1 mL细胞悬液中加入50 μL Cocktail溶液，室温孵育20 min。RapidSpheres™旋涡震荡30 s，使磁珠均匀分散，取75 μL RapidSpheres™加入细胞悬液中，室温孵育5 min，利用含2%胎牛血清、0.02 mol·L^{-1} EDTA的PBS溶液定容至2.5 mL，流式管插入磁铁中，室温孵育2.5 min，取出磁铁，将细胞倒入新的离心管中，即获得$CD8^+$ T细胞。随后用含10%胎牛血清和100 U·mL^{-1}青/链霉素的RPMI 1640培养基进行细胞培养。取$CD8^+$ T细胞（1×10^5个），分别向其中加入CD3、CD8抗体，4 ℃避光孵育20 min，流式细胞仪检测$CD8^+$ T细胞比例。

2.7 $CD8^+$ T细胞体外杀伤效果检测

$CD8^+$ T细胞、HepG2细胞（转染组别见“2.4”项）分别充当效应细胞和靶细胞。将HepG2细胞（1×10^4·mL^{-1}）接种于96孔板中，按靶效比30∶1的比例加入$CD8^+$ T细胞，至每孔100 μL，同时设置单独培养效应细胞、单独培养靶细胞组。共培养18 h后，按照细胞毒性试剂盒检测$CD8^+$ T细胞对HepG2细胞的杀伤作用。步骤如下，每孔加入10 μL乳酸脱氢酶释放试剂，室温孵育30 min，离心收集上清，酶标仪检测各组上清液吸光度（*A*）值。

$$细胞裂解率=(A_{共培养效应细胞+靶细胞}-A_{单独培养效应细胞}-A_{单独培养靶细胞})/(A_{靶细胞全部裂解}-A_{单独培养效应细胞})$$

按照ELISA检测试剂盒检测共培养上清液中肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、γ-干扰素（IFN-γ）水平。步骤如下：收集各组细胞共培养上清液，进行抗原包被，经过封闭液封闭，加入标准品和待测样品，酶标抗体，显色液显色，终止液终止反应，酶标仪检测*A*值。绘制标准曲线，计算各组上清液中TNF-α、IFN-γ水平。

2.8 $CD8^+$ T细胞体内杀伤效果检测

收集各组裸鼠移植瘤组织，用眼科剪剪碎后，加入胶原酶进行消化，将消化后的组织置于70 μm细胞筛网上，并用注射器活塞轻轻研磨，至肿瘤组织完全分散为单细胞，离心收集细胞，加入CD3、CD8抗体，流式细胞术检测移植瘤中$CD8^+$ T细胞浸润情况。

收集各组裸鼠移植瘤组织，加入PBS溶液进行匀浆，离心收集匀浆后上清液，ELISA检测各组移植瘤中TNF-α、IFN-γ水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行统计分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD/*t*检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肝癌细胞中miR-140-3p.2、PD-L1的表达

qRT-PCR和Western blotting结果显示，与人肝正常细胞L-02相比，人肝癌细胞系HepG2、Hep3B、HuH-7中*miR-140-3p. 2*水平明显降低，PD-L1 mRNA和蛋白水平明显升高（$P<0.05$）。且上述指标表达量变化在HepG2中最显著，因此选择HepG2进行后续转染。见图1。

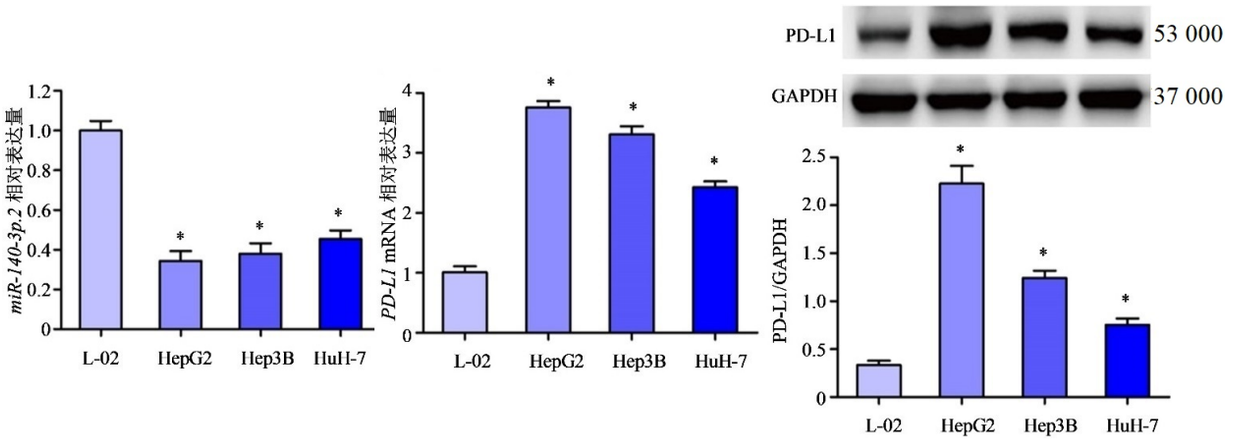
3.2 miR-140-3p.2靶向调控PD-L1的表达

Targetscan数据库预测显示，miR-140-3p.2和PD-L1（CD274）存在结合位点。此外，双荧光素酶报告基因实验显示，与miR-NC组相比，miR-140-3p.2组细胞中PD-L1 WT荧光素酶活性明显降低（$P<0.05$），而PD-L1 MUT荧光素酶活性无明显变化（图2）。

qRT-PCR和Western blotting结果显示，与miR-NC组相比，miR-140-3p.2组细胞中*miR-140-3p.2*水平明显升高，PD-L1 mRNA和蛋白水平明显降低（$P<0.05$）；与NC组相比，PD-L1组细胞中*miR-140-3p.2*水平明显降低，PD-L1 mRNA和蛋白水平明显升高（$P<0.05$）；与miR-140-3p.2＋NC组相比，miR-140-3p.2＋PD-L1组细胞中*miR-140-3p.2*水平明显降低，PD-L1 mRNA和蛋白水平明显升高（$P<0.05$）。见图2。

3.3 miR-140-3p.2靶向PD-L1的表达增强$CD8^+$ T细胞的体外杀伤能力

细胞毒性实验显示，与miR-NC组相比，miR-140-3p.2组细胞裂解率明显升高（$P<0.05$）；与NC组相比，PD-L1组细胞裂解率明显降低（$P<0.05$）；与miR-140-3p.2＋NC组相比，miR-140-3p.2＋PD-



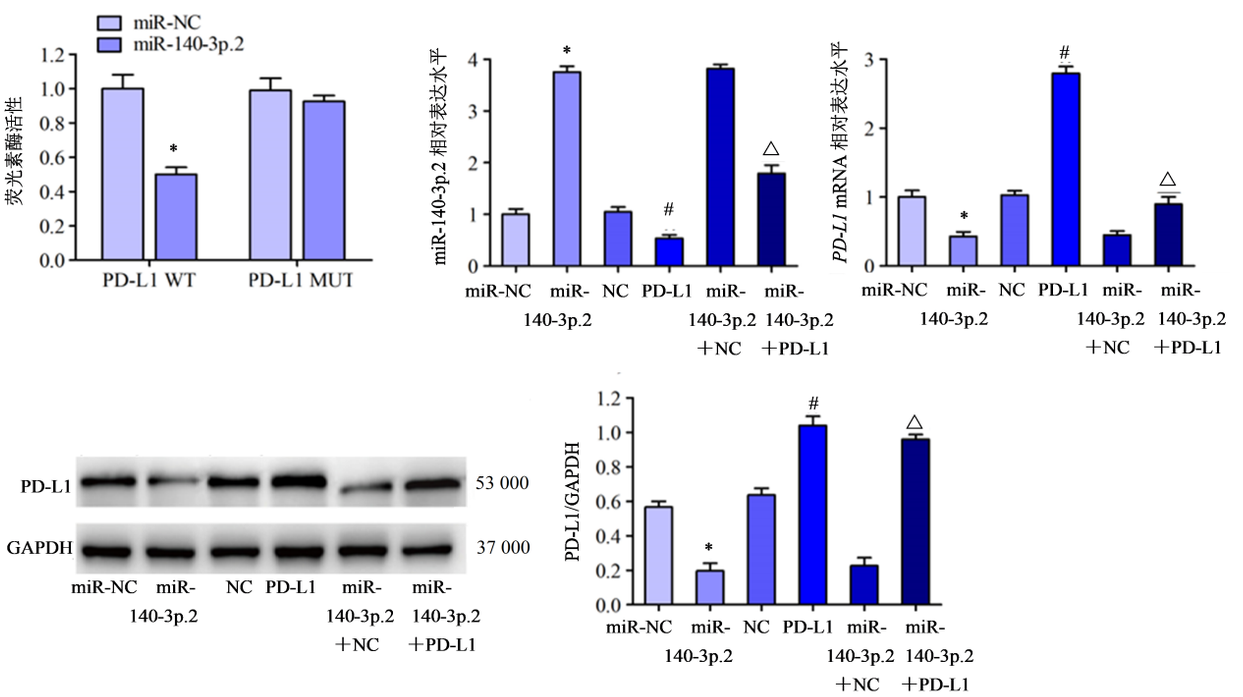
与L-02组比较：*P<0.05。

*P < 0.05 *vs* L-02 group.

图1 肝癌细胞系中miR-140-3p.2、PD-L1的表达（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 1 Expression of miR-140-3p.2 and PD-L1 in liver cancer cells line（$\bar{x}\pm s$，n=3）

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 43-49 of CD274 3' UTR	5' ...GCAGGGAUUCUCAACCUGUGGUU...
hsa-miR-140-3p.2	3' GGCACCAAGAUGG-GACACCAU



与miR-NC组比较：*P<0.05；与NC组比较：#P<0.05；与miR-140-3p.2+NC组比较：△P<0.05。

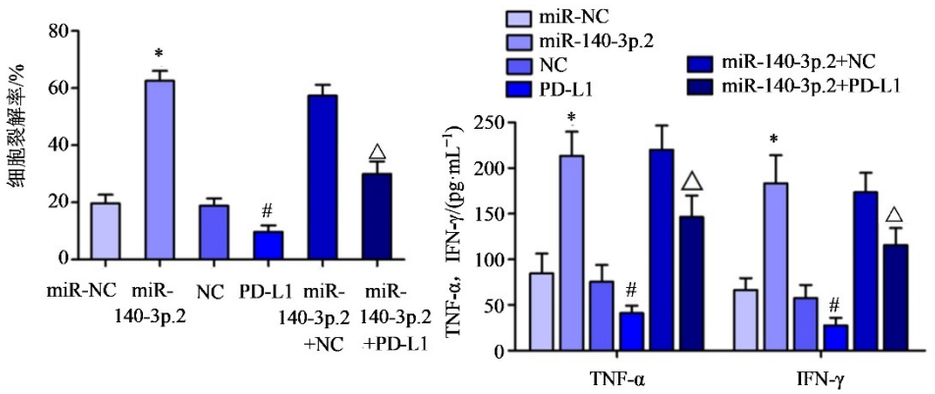
*P < 0.05 *vs* miR-NC group；#P < 0.05 *vs* miR-NC group；△P < 0.05 *vs* miR-140-3p.2+NC group.

图2 miR-140-3p.2靶向调控PD-L1的表达（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 2 miR-140-3p.2 targets PD-L1 expression（$\bar{x}\pm s$，n=3）

L1组细胞裂解率明显降低（P<0.05）。

ELISA结果显示，与miR-NC组相比，miR-140-3p.2组细胞共培养上清液中TNF-α、IFN-γ水平明显升高（P<0.05）；与NC组相比，PD-L1组细胞共培养上清液中TNF-α、IFN-γ水平明显降低（P<0.05）；与miR-140-3p.2+NC组相比，miR-140-3p.2+PD-L1组细胞共培养上清液中TNF-α、IFN-γ水平明显降低（P<0.05）。见图3。



与 miR-NC 组比较：$^{*}P<0.05$；与 NC 组比较：$^{\#}P<0.05$；与 miR-140-3p.2+NC 组比较：$^{\triangle}P<0.05$。

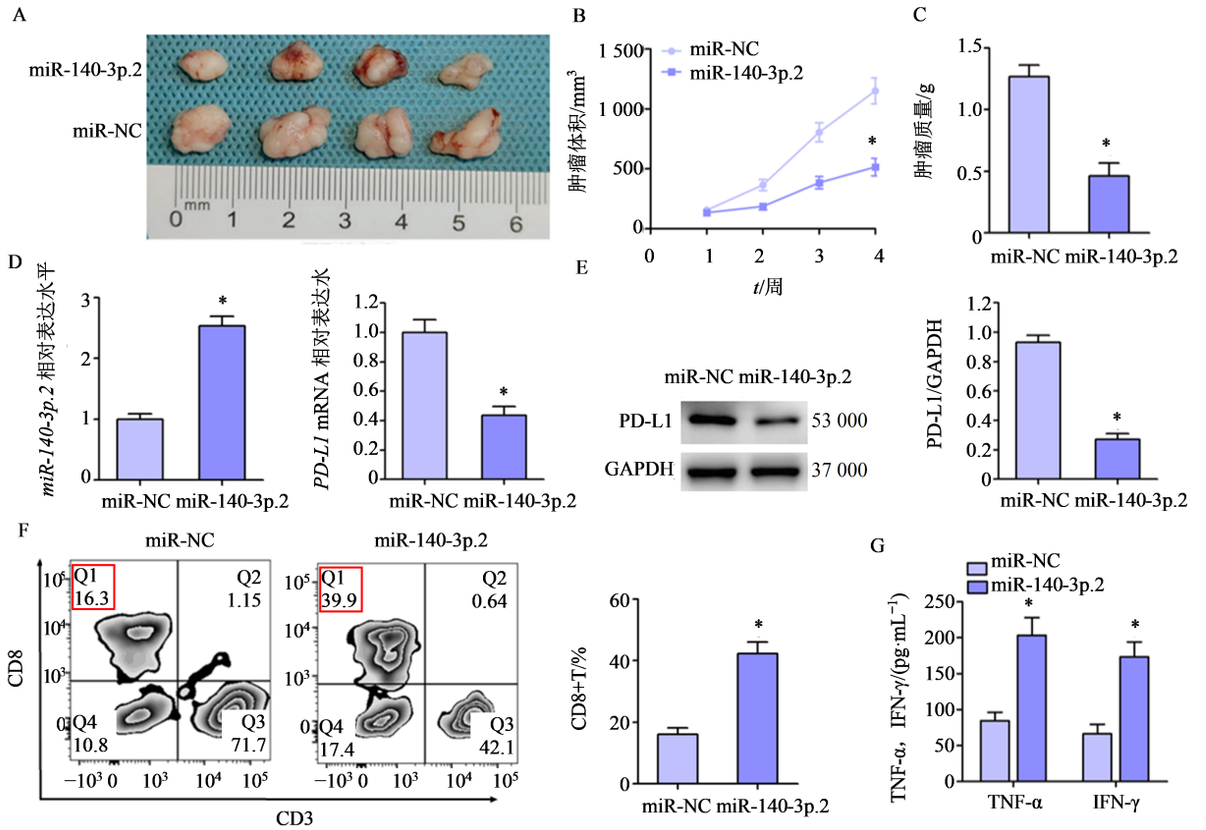
$^{*}P<0.05$ *vs* miR-NC group；$^{\#}P<0.05$ *vs* miR-NC group；$^{\triangle}P<0.05$ *vs* miR-140-3p.2+NC group.

图 3　miR-140-3p.2 靶向 PD-L1 的表达增强 CD8⁺ T 细胞的体外杀伤能力（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 3　miR-140-3p.2 targets PD-L1 expression to enhance *in vitro* killing ability of CD8⁺T cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

3.4　miR-140-3p.2 增强 CD8⁺ T 细胞的体内杀伤能力

如图 4 所示，裸鼠成瘤 4 周后，与 miR-NC 组相比，miR-140-3p.2 组移植瘤体积和质量明显减小（$P<0.05$）。qRT-PCR 和 Western blotting 结果显示，与 miR-NC 组相比，miR-140-3p.2 组移植瘤中 *miR-140-3p.2* 水平明显升高，PD-L1 mRNA 和蛋



A-裸鼠移植瘤形态；B-移植瘤体积；C-移植瘤质量；D-qRT-PCR 检测移植瘤中 *miR-140-3p.2*、*PD-L1* mRNA 水平；E-Western blotting 检测移植瘤中 PD-L1 蛋白水平；F-流式细胞术检测移植瘤中 CD8⁺ T 细胞浸润情况；G-ELISA 检测移植瘤中 TNF-α、IFN-γ 水平；与 miR-NC 组比较：$^{*}P<0.05$。

A-Morphology of nude mouse transplanted tumor; B-Transplanted tumor volume; C-Transplanted tumor quality; D-qRT-PCR was used to detect *miR-140-3p.2* and *PD-L1* mRNA levels in transplanted tumors; E-Western blotting was used to detect PD-L1 protein levels in transplanted tumors; F-Flow cytometry was used to detect CD8⁺ T cell infiltration in transplanted tumors; G-ELISA was used to detect TNF-α, IFN-γ levels in transplanted tumors; $^{*}P<0.05$ *vs* miR-NC group.

图 4　miR-140-3p.2 增强 CD8⁺ T 细胞的体内杀伤能力（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 4　miR-140-3p.2 enhances *in vivo* killing ability of CD8⁺ T cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

白水平明显降低（$P<0.05$）。流式细胞术结果显示，与miR-NC组相比，miR-140-3p.2组移植瘤中$CD8^+$ T细胞浸润水平明显升高（$P<0.05$）。ELISA结果显示，与miR-NC组相比，miR-140-3p.2组移植瘤中TNF-α、IFN-γ水平明显升高（$P<0.05$）。

4 讨论

近年来，肿瘤免疫疗法（如嵌合抗原受体T细胞和PD-1/PD-L1免疫检查点抑制剂）在肿瘤治疗方面取得了显著进步[15]。在肿瘤免疫应答机制中，肿瘤细胞会增强细胞表面PD-L1的表达，PD-L1通过与T细胞表面的PD-1相互作用，进而削弱T细胞对肿瘤细胞的攻击能力，肿瘤细胞得以在免疫应答过程中实现免疫逃逸[16]。$CD8^+$ T细胞作为一种重要的细胞毒性T细胞，可通过释放穿孔素、颗粒酶等物质发挥杀伤肿瘤细胞的作用。然而，在肿瘤进展中，$CD8^+$ T细胞的活性常受到多种机制的抑制，如Sonic Hedgehog通路通过激活肿瘤微环境中PD-L1的表达，以抑制肿瘤浸润的$CD8^+$ T细胞功能；而蛋氨酸代谢失调与$CD8^+$ T细胞耗竭密切相关[17-18]。因此，深入探索影响$CD8^+$ T细胞功能的分子机制，对于提升肝癌的免疫治疗效果具有重要意义。

研究表明，miR-140-3p在多种肿瘤（包括胃癌[19]、宫颈癌[20]、膀胱癌[21]等）中呈现低表达，且与肿瘤的复发和转移密切相关。另有研究显示，miR-140-3p能够抑制肝癌细胞的增殖和体内肿瘤的生长[22]。本研究同样显示，与人肝正常细胞L-02相比，人肝癌细胞系HepG2、Hep3B、HuH-7中*miR-140-3p.2*水平明显降低，提示miR-140-3p.2可能在肝癌中发挥抑癌基因作用。然而，关于miR-140-3p.2是否通过调控$CD8^+$ T细胞功能影响肝癌进展，目前尚不清楚。为此，本研究构建了过表达miR-140-3p.2的HepG2细胞模型，并发现过表达miR-140-3p.2后，细胞中*miR-140-3p.2*水平升高，而PD-L1水平降低；当过表达miR-140-3p.2的HepG2细胞与$CD8^+$ T细胞共培养后，HepG2细胞裂解率和共培养上清液中TNF-α、IFN-γ水平升高，表明miR-140-3p.2能够增强$CD8^+$ T细胞对肝癌细胞的杀伤作用。此外，体内实验也证实，过表达miR-140-3p.2能够抑制裸鼠体内肿瘤的形成，并降低移植瘤中PD-L1的表达水平，同时促进$CD8^+$ T细胞的浸润。通过生物信息学分析和双荧光素酶实验，进一步验证了miR-140-3p.2与PD-L1之间存在直接的靶向关系。为进一步证实miR-140-3p.2对$CD8^+$ T细胞功能的影响是通过调控PD-L1表达实现的，本研究构建了过表达PD-L1的HepG2细胞模型，发现过表达PD-L1后，细胞中miR-140-3p.2水平降低，而PD-L1水平升高；同时HepG2细胞裂解率和共培养上清液中TNF-α、IFN-γ水平降低。此外，过表达PD-L1能够部分逆转过表达miR-140-3p.2对$CD8^+$ T细胞的调控作用。这表明miR-140-3p.2通过靶向PD-L1表达，进而增强$CD8^+$ T细胞对肝癌细胞的杀伤作用。其调控机制可能为miR-140-3p.2表达升高抑制了肝癌细胞表面PD-L1水平，PD-L1未能与$CD8^+$ T细胞表面PD-1结合，$CD8^+$ T细胞毒性没有被抑制，从而发挥杀伤肿瘤细胞的作用，避免了肝瘤细胞的免疫逃逸。见图5。

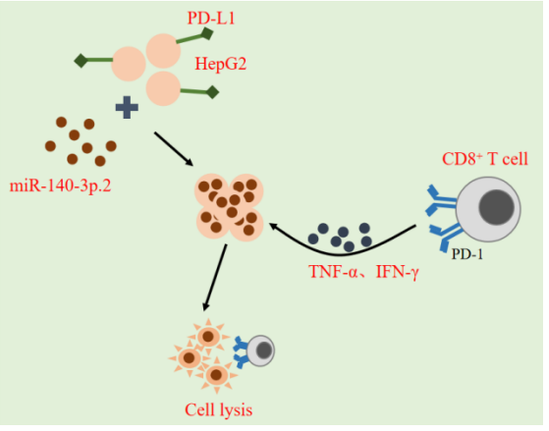


图5 miR-140-3p.2靶向PD-L1表达增强$CD8^+$ T细胞对肝癌细胞的杀伤作用

Fig. 5 MiR-140-3p.2 enhances killing effect of $CD8^+$ T cells on liver cancer cells by targeting PD-L1 expression

miR-140-3p.2在肝癌细胞中低表达，miR-140-3p.2通过靶向调控PD-L1表达增强$CD8^+$ T细胞对肝癌细胞的杀伤作用，这一发现为肝癌的免疫治疗提供了新的思路和潜在的靶点，即miR-140-3p.2/PD-L1轴有望成为肝癌免疫治疗的新策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ganesan P, Kulik L M. Hepatocellular carcinoma: New developments [J]. Clin Liver Dis, 2023, 27(1): 85-102.

[2] Alawyia B, Constantinou C. Hepatocellular carcinoma: A narrative review on current knowledge and future prospects [J]. Curr Treat Options Oncol, 2023, 24(7): 711-724.

[3] Wen N Y, Cai Y L, Li F Y, et al. The clinical management of hepatocellular carcinoma worldwide: A concise review and comparison of current guidelines: 2022 update [J]. Biosci Trends, 2022, 16(1): 20-30.

[4] Zhou M Z, Liu B R, Shen J. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma [J]. Clin Exp Med, 2023, 23(3): 569-577.

[5] Chen J Q, Zhang D, Yuan Y. Anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in conversion treatment of locally advanced hepatocellular carcinoma [J]. Clin Exp Med, 2023, 23(3): 579-590.

[6] Deng Z, Teng Y J, Zhou Q, et al. Shuyu pills inhibit immune escape and enhance chemosensitization in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastrointest Oncol, 2021, 13(11): 1725-1740.

[7] Tan J Z, Fan W Z, Liu T, et al. TREM2^{+} macrophages suppress CD8^{+} T-cell infiltration after transarterial chemoembolisation in hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2023, 79(1): 126-140.

[8] Hu Z Q, Chen G, Zhao Y P, et al. Exosome-derived circCCAR1 promotes CD8^{+} T-cell dysfunction and anti-PD1 resistance in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 55.

[9] Mallela V R, Rajtmajerová M, Trailin A, et al. miRNA and lncRNA as potential tissue biomarkers in hepatocellular carcinoma [J]. Noncoding RNA Res, 2023, 9(1): 24-32.

[10] You S, Cheng N M, Wang F, et al. Hsa_circ_0001687 function as a ceRNA to facilitate hepatocellular carcinoma progression *via* miR-140- 3p/FOXQ1 axis [J]. Protein Pept Lett, 2023, 30(11): 930-940.

[11] Gao C C, Wen Y Z, Jiang F, et al. Circular RNA circ_0008274 upregulates granulin to promote the progression of hepatocellular carcinoma via sponging microRNA-140-3p [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 1890-1901.

[12] 高妍, 王忠巧 . LncRNA HCG18 通过靶向 miR-140-3p/PD-L1 通路对鼻咽癌细胞生物学行为的影响 [J]. 生物医学工程与临床, 2024, 28(1): 103-113.
Gao Y, Wang Z Q. Effect of lncRNA HCG18 on biological behavior of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting miR-140-3p/PD-L1 pathway [J]. Biomed Eng Clin Med, 2024, 28(1): 103-113.

[13] Jiang W, Li T, Wang J J, et al. miR-140-3p suppresses cell growth and induces apoptosis in colorectal cancer by targeting PD-L1 [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 10275-10285.

[14] 袁军, 李燕, 李杰, 等 . LncRNA XIST 通过调控 miR-140-3p/PD-L1 轴促进弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞的增殖与迁移 [J]. 免疫学杂志, 2022, 38(6): 535-543.
Yuan J, Li Y, Li J, et al. LncRNA XIST promotes the proliferation and migration of diffuse large B-cell lymphoma cells by regulating the miR-140-3p/PD-L1 axis [J]. Immunol J, 2022, 38(6): 535-543.

[15] Dolton G, Rius C, Wall A, et al. Targeting of multiple tumor-associated antigens by individual T cell receptors during successful cancer immunotherapy [J]. Cell, 2023, 186(16): 3333-3349.e27.

[16] Onkar S S, Carleton N M, Lucas P C, et al. The great immune escape: Understanding the divergent immune response in breast cancer subtypes [J]. Cancer Discov, 2023, 13(1): 23-40.

[17] Petty A J, Dai R, Lapalombella R, et al. Hedgehog-induced PD-L1 on tumor-associated macrophages is critical for suppression of tumor-infiltrating CD8^{+} T cell function [J]. JCI Insight, 2021, 6(6): e146707.

[18] Hung M H, Lee J S, Ma C, et al. Tumor methionine metabolism drives T-cell exhaustion in hepatocellular carcinoma [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1455.

[19] Chen J L, Cai S Q, Gu T C, et al. MiR-140-3p impedes gastric cancer progression and metastasis by regulating BCL2/BECN1-mediated autophagy [J]. Onco Targets Ther, 2021, 14: 2879-2892.

[20] Wang N, Zheng Y, Zhang X, et al. Roles of circ_0000135/miR-140-3p/PDZK1 network in cervical cancer [J]. Clin Transl Oncol ,2022, 24(6): 1086-1099.

[21] Wang Y, Chen J W, Wang X, et al. miR-140-3p inhibits bladder cancer cell proliferation and invasion by targeting FOXQ1 [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(20): 20366-20379.

[22] Li J Q, Zhao J, Wang H, et al. MicroRNA-140-3p enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by targeting pregnenolone X receptor [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 5885-5894.

[责任编辑 兰新新]