

[文章编号] 1671-587X(2025)03-0653-10

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250310

沉默生物节律基因 *TIMELESS* 对卵巢癌 SK-OV-3 细胞免疫逃逸的抑制作用及其机制

顾雨玲, 郑 翠, 汤云仙

(南京医科大学附属苏州医院 苏州市立医院妇产科, 江苏 南京 215000)

[摘要] **目的:** 探讨沉默生物节律基因 *TIMELESS* (*TIM*) 对卵巢癌细胞免疫逃逸的影响, 并阐明其相关作用机制。**方法:** 分离 CD8⁺T 淋巴细胞, 并采用流式细胞术进行鉴定, 检测细胞中 CD3⁺/CD8⁺ 细胞亚群比例。体外培养人卵巢癌 SK-OV-3 细胞, 分别转染 *TIM* 小干扰 RNA (siRNA) 干扰质粒 (si-*TIM*)、阴性对照质粒 (si-NC)、程序性死亡配体 1 (PD-L1) 过表达质粒 (oe-PD-L1) 及其阴性对照质粒 (oe-NC), 分为空白对照组 (BC 组, 不进行转染)、si-NC 组 (转染 si-NC)、si-*TIM* 组 (转染 si-*TIM*)、si-NC+oe-NC 组 (转染 si-NC 和 oe-NC) 和 si-*TIM*+oe-PD-L1 (转染 si-*TIM* 和 oe-PD-L1) 组。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blotting 法检测 SK-OV-3 细胞中 *TIM* mRNA 及蛋白表达水平, 验证 *TIM* 基因沉默情况。将转染后的 SK-OV-3 细胞与激活的 CD8⁺T 淋巴细胞共培养, 分为 BC 组 (单独培养 SK-OV-3 细胞)、BC/T 组、si-NC/T 组、si-*TIM*/T 组、si-NC+oe-NC/T 组和 si-*TIM*+oe-PD-L1/T 组, 采用 CCK-8 法检测各组 SK-OV-3 细胞存活率, 流式细胞术检测各组 SK-OV-3 细胞凋亡率和细胞表面 PD-L1 阳性表达率, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测共培养上清液中干扰素 γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平, 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放法检测各组 CD8⁺T 淋巴细胞杀伤力, RT-qPCR 法检测各组 SK-OV-3 细胞中 *TIM* 和 PD-L1 mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组 SK-OV-3 细胞中 *TIM* 和 PD-L1 蛋白表达水平。**结果:** 免疫磁珠法分离后, CD8⁺T 淋巴细胞 (CD3⁺/CD8⁺) 亚群比例为 96.56% \pm 0.59%, 提示所提取 CD8⁺T 淋巴细胞纯度较高。与 BC 组比较, si-*TIM* 组细胞中 *TIM* mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.01$), 提示本研究成功获得 *TIM* 基因沉默的卵巢癌 SK-OV-3 细胞。CCK-8 法, 与 BC 组比较, BC/T 组 SK-OV-3 细胞存活率明显降低 ($P<0.01$); 与 BC/T 组比较, si-*TIM*/T 组 SK-OV-3 细胞存活率明显降低 ($P<0.01$)。流式细胞术, 与 BC 组比较, BC/T 组 SK-OV-3 细胞凋亡率明显升高 ($P<0.01$); 与 BC/T 组比较, si-*TIM*/T 组 SK-OV-3 细胞凋亡率明显升高 ($P<0.01$); 与 si-*TIM*/T 组比较, si-*TIM*+oe-PD-L1/T 组 SK-OV-3 细胞凋亡率明显降低 ($P<0.01$)。与 BC 组比较, si-*TIM* 组 SK-OV-3 细胞表面 PD-L1 阳性表达率明显降低 ($P<0.01$)。ELISA 法, 与 BC/T 组比较, si-*TIM*/T 组细胞培养上清液中 IFN- γ 和 TNF- α 水平均明显升高 ($P<0.01$); 与 si-*TIM*/T 组比较, si-*TIM*+oe-PD-L1/T 组细胞培养上清液中 IFN- γ 和 TNF- α 水平均明显降低 ($P<0.01$)。LDH 释放法, 与 BC/T 组比较, si-*TIM*/T 组 CD8⁺T 淋巴细胞杀伤力明显增强 ($P<0.01$); 与 si-*TIM*/T 组比较, si-*TIM*+oe-PD-L1/T 组 CD8⁺T 淋巴细胞杀伤力明显减弱 ($P<0.01$)。RT-qPCR 法和 Western blotting 法, 与 BC 组比较, si-*TIM* 组 SK-OV-3 细胞中 PD-L1 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.01$); 与 si-*TIM* 组比较, si-*TIM*+oe-PD-L1 组细胞中 PD-L1 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$)。**结论:** *TIM* 基因沉默可增强 CD8⁺T 淋巴细胞对卵巢癌 SK-OV-3 细胞的杀伤作用, 抑制其免疫逃逸,

[收稿日期] 2024-07-18 [录用日期] 2024-09-07

[基金项目] 江苏省卫健委省妇幼保健科研项目 (F202207)

[作者简介] 顾雨玲 (1995-), 女, 江苏省苏州市人, 住院医师, 医学硕士, 主要从事妇科肿瘤基础和临床方面的研究。

[通信作者] 汤云仙, 副主任医师 (E-mail: guyuling95@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

其作用机制可能与调控PD-L1蛋白表达有关。

[关键词] 卵巢癌; 免疫逃逸; *TIMELESS*基因; CD8+T淋巴细胞; 程序性死亡配体1

[中图分类号] R737.31 [文献标志码] A

Inhibitory effect of silencing of circadian rhythm gene *TIMELESS* on immune escape of ovarian cancer SK-OV-3 cells and its mechanism

GU Yuling, ZHENG Cui, TANG Yunxian

(Department of Obstetrics and Gynecology, Suzhou Municipal Hospital, Affiliated Suzhou Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 215000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of circadian rhythm gene *TIMELESS* (TIM) silencing on immune escape of the ovarian cancer cells, and to clarify its related mechanism. **Methods:** The CD8+T lymphocytes were isolated and identified by flow cytometry to detect the proportion of CD3+/CD8+ cell subsets. The human ovarian cancer SK-OV-3 cells were cultured *in vitro* and divided into interference plasmid transfected with TIM small interfering (siRNA) (si-TIM), negative control plasmid (si-NC), programmed death ligand 1 (PD-L1) over-expression plasmid (oe-PD-L1), and negative control plasmid (oe-NC) groups. The cells were further divided into blank control group (BC group, non-transfection), si-NC group (transfected with si-NC), si-TIM group (transfected with si-TIM), si-NC+oe-NC group (transfected with si-NC and oe-NC), and si-TIM+oe-PD-L1 group (transfected with si-TIM and oe-PD-L1). Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of TIM mRNA and protein in the SK-OV-3 cells to verify TIM gene silencing. The transfected SK-OV-3 cells were co-cultured with activated CD8+T lymphocytes and divided into BC group (SK-OV-3 cells cultured alone), BC/T group, si-NC/T group, si-TIM/T group, si-NC+oe-NC/T group, and si-TIM+oe-PD-L1/T group. CCK-8 method was used to detect the survival rates of the SK-OV-3 cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the SK-OV-3 cells and positive expression rate of PD-L1 on surface of the cells in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the levels of interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the co-culture supernatant; lactate dehydrogenase (LDH) release assay was used to detect the cytotoxicity of the CD8+T lymphocytes in various groups; RT-qPCR method was used to detect the expression levels of TIM and PD-L1 mRNA in the SK-OV-3 cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of TIM and PD-L1 proteins in the SK-OV-3 cells in various groups. **Results:** After separated with immune magnetic bead method, the proportion of CD8+T lymphocyte (CD3+/CD8+) subsets was (96.56% \pm 0.59%), indicating high purity of the extracted CD8+T lymphocytes. Compared with BC group, the expression levels of TIM mRNA and protein in the cells in si-TIM group were significantly decreased ($P<0.01$), suggesting successful TIM gene silencing in the ovarian cancer SK-OV-3 cells. The CCK-8 results showed that compared with BC group, the survival rate of the SK-OV-3 cells in BC/T group was significantly decreased ($P<0.01$); compared with BC/T group, the survival rate of the SK-OV-3 cells in si-TIM/T group was significantly decreased ($P<0.01$). The flow cytometry results showed that compared with BC group, the apoptotic rate of the SK-OV-3 cells in BC/T group was significantly increased ($P<0.01$); compared with BC/T group, the apoptotic rate of the SK-OV-3 cells in si-TIM/T group was significantly increased ($P<0.01$); compared with si-TIM/T group, the apoptotic rate of the SK-OV-3 cells in si-TIM+oe-PD-L1/T

group was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with BC group, the positive expression rate of PD-L1 on surface of the SK-OV-3 cells in si-TIM group was significantly decreased ($P < 0.01$). The ELISA results showed that compared with BC/T group, the levels of IFN- γ and TNF- α in the culture supernatant in si-TIM/T group were significantly increased ($P < 0.01$); compared with si-TIM/T group, the levels of IFN- γ and TNF- α in the supernatant in si-TIM+oe-PD-L1/T group were significantly decreased ($P < 0.01$). The LDH release assay results showed that compared with BC/T group, the cytotoxicity of the CD8+T lymphocytes in si-TIM/T group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with si-TIM/T group, the cytotoxicity of the CD8+T lymphocytes in si-TIM+oe-PD-L1/T group was significantly weakened ($P < 0.01$). The RT-qPCR and Western blotting results showed that compared with BC group, the expression levels of PD-L1 mRNA and protein in the SK-OV-3 cells in si-TIM group were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with si-TIM group, the expression level of PD-L1 protein in the cells in si-TIM+oe-PD-L1 group was significantly increased ($P < 0.01$).

Conclusion: TIM gene silencing enhances the cytotoxic effect of CD8+T lymphocytes on ovarian cancer SK-OV-3 cells and inhibits immune escape, and its mechanism may be related to the regulation of PD-L1 protein expression.

KEYWORDS Ovarian cancer; Immune escape; *TIMELESS* gene; CD8+T lymphocytes; Programmed death ligand 1

卵巢癌是全球女性妇科癌症相关死亡的主要原因之一, 由于疾病早期阶段缺乏特定的症状和体征, 约 75% 的卵巢癌患者发展至晚期才被诊断, 其中超过 70% 的患者对初级治疗无效, 且 5 年复发率较高^[1]。晚期诊断和耐药性是导致卵巢癌高发率及治疗失败的 2 个主要因素^[2]。目前, 在妇科恶性肿瘤领域存在多种乳腺癌和卵巢癌潜在的治疗靶点, 靶向治疗具有很好的应用前景^[3]。肿瘤免疫逃逸是肿瘤发生发展的重要环节, 肿瘤细胞可以发展多种免疫抑制机制以对抗肿瘤免疫^[4]。程序性死亡配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) /程序性死亡受体 1 (programmed death receptor-1, PD-1) 信号通路是肿瘤免疫抑制的重要组成部分, 可以抑制 T 淋巴细胞活化, 增强肿瘤细胞的免疫耐受性, 从而实现肿瘤免疫逃逸^[5]。因此, 靶向 PD-L1/PD-1 信号通路是一种具有较强吸引力的肿瘤治疗策略。生物节律分子 *TIMELESS* (TIM) 最初被认为是一种潜在的生物钟蛋白, 现已被证实其为 DNA 复制叉的重要组成部分, 可以保护 DNA 复制叉不在难以复制的区域停滞, 并在 DNA 损伤中发挥重要保护和修复作用^[6]。*TIM* 基因还可作为一种癌基因, 在多种癌症中呈过度表达, 使肿瘤细胞免受 DNA 损伤和化疗耐药性^[7]。研究^[8]显示: *TIM* 基因缺失可激活结肠癌细胞的上皮-间质转化程序, 并与结肠癌患者预后差有关。研究^[9-10]显示: TIM 蛋白在人卵巢癌组织中高表达, 沉默

TIM 基因可抑制卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭。研究^[11]显示: TIM 蛋白高表达可增强 PD-L1 的转录水平, 从而促进乳腺癌的侵袭性和恶性进展, 有助于肿瘤免疫逃逸, 而当其表达下调时, 会增加 CD8+T 淋巴细胞的抗肿瘤活性。然而, *TIM* 基因是否通过调节 PD-L1 影响卵巢癌细胞免疫逃逸尚不明确。因此, 本研究探讨 *TIM* 基因沉默对卵巢癌细胞免疫逃逸的影响, 并阐明其分子机制, 以期为卵巢癌治疗策略的研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人卵巢癌细胞系 SK-OV-3 细胞购自美国模式培养物研究所 (American type culture collection, ATCC)。RPMI-1640 培养基和人白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 重组蛋白购自赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司, DynabeadsTM UntouchedTM 人 CD8+T 淋巴细胞试剂盒、Lipofectamine 3000 转染试剂、CD8-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)、CD3-藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 和 PD-L1-PE 抗体购自美国 ThermoFisher Scientific 公司, T Cell TransAct 购自德国 Miltenyi 公司, CCK-8 试剂盒和 Annexin V/FITC 凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, 干扰素 γ (interferon- γ , INF- γ) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 检测试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司, 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 细胞毒

性检测试剂盒、TRIzol试剂和RIPA裂解液购自上海碧云天生物技术股份有限公司, 逆转录试剂盒和SYBR Green Master Mix购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 兔抗人PD-L1抗体、兔抗人TIM抗体、兔抗人GAPDH抗体和二抗购自英国Abcam公司, TIM小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 干扰质粒 (si-TIM)、阴性对照质粒 (si-NC)、PD-L1过表达质粒 (oe-PD-L1) 及其阴性对照质粒 (oe-NC) 由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。流式细胞仪购自美国Beckman公司, 酶标仪购自美国Bio Tek公司, 实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪购自瑞士Roche公司, 电泳仪和电泳槽购自北京六一生物科技有限公司。

1.2 CD8+T淋巴细胞分离及鉴定 收集健康体检者外周血, 梯度离心获得人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。根据Dynabeads™ Untouched™人CD8+T淋巴细胞试剂盒说明书, 采用免疫磁珠法分离, 即取500 μL (约含 5×10^7 个细胞) PBMC, 加入100 μL抗体混合物, 于4℃孵育20 min; 加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) 洗涤细胞, 离心弃上清液; 加入500 μL免疫磁珠, 轻轻倾斜和旋转, 室温反应15 min; 加入2 mL PBS缓冲液, 将细胞放置于磁力架上静置2 min, 收集上清液。向磁珠中加入2 mL PBS缓冲液, 经磁力架吸附后, 再次收集上清液, 将2次收集的上清液混合, $1\ 200\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, 收集细胞沉淀即为CD8+T淋巴细胞。采用流式细胞术对CD8+T淋巴细胞进行鉴定, 检测细胞中CD3+/CD8+细胞亚群比例。

1.3 细胞转染、分组和共培养 收集SK-OV-3细胞接种于6孔细胞培养板中, 每孔约含 2×10^5 个细胞, 将SK-OV-3细胞分为空白对照组(BC组)、si-NC组、si-TIM组、si-NC+oe-NC组和si-TIM+oe-PD-L1组, 采用Lipofectamine 3000转染试剂分别将si-TIM、si-NC、oe-PD-L1和oe-NC分别转染至除BC组外的相应组SK-OV-3细胞中, BC组不进行转染, 转染48 h后收集细胞。采用RT-qPCR法和Western blotting法检测SK-OV-3细胞中TIM mRNA及蛋白表达水平, 验证卵巢癌SK-OV-3细胞中TIM基因沉默情况。于CD8+T淋巴细胞培养基中补充 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ IL-2重组蛋白, 采用T Cell TransAct试剂刺激CD8+T淋

巴细胞活化。取转染后的各组SK-OV-3细胞与活化的CD8+T淋巴细胞按照1:10的比例于Transwell小室中进行间接共培养, 并将其分为BC组(单独培养SK-OV-3细胞)、BC/T组、si-NC/T组、si-TIM/T组、si-NC+oe-NC/T组和si-TIM+oe-PD-L1/T组, 共培养时间为24 h。

1.4 CCK-8法检测各组SK-OV-3细胞存活率 于96孔细胞培养板下室中以每孔 1×10^3 个细胞的密度接种SK-OV-3细胞, 建立上述共培养体系, 共培养24 h后, 取出CD8+T淋巴细胞, 于含有SK-OV-3细胞的孔内加入10 μL CCK-8溶液, 继续培养2 h。采用酶标仪于波长450 nm处测定吸光度(A)值, 计算各组细胞存活率。细胞存活率=(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值)×100%。

1.5 流式细胞术检测各组SK-OV-3细胞凋亡率

收集共培养体系中的SK-OV-3细胞, $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, 弃上清, 加入结合缓冲液调整细胞浓度为 $2 \times 10^6\ \text{mL}^{-1}$ 。取100 μL细胞悬液, 加入5 μL Annexin V/FITC和5 μL PI溶液孵育5 min。加入400 μL PBS缓冲液, 混匀后于流式细胞仪上检测细胞凋亡率。细胞凋亡率=早期细胞凋亡率+晚期细胞凋亡率。

1.6 流式细胞术检测各组SK-OV-3细胞表面PD-L1阳性表达率

收集共培养体系中的SK-OV-3细胞, $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, 弃上清, 加入PBS缓冲液重悬细胞沉淀, 并调整细胞密度为 $2 \times 10^6\ \text{mL}^{-1}$ 。加入5 μL PD-L1-PE抗体室温避光孵育30 min。PBS缓冲液洗涤细胞, 加入400 μL PBS缓冲液重悬后于流式细胞仪上检测PD-L1阳性表达率。

1.7 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测各组共培养体系细胞培养上清液中IFN-γ和TNF-α水平

收集共培养体系中细胞培养上清液, 按照ELISA试剂盒说明书加入标准品、样本和检测液等进行反应, 加入底物溶液进行显色, 最后加入终止液终止反应。采用酶标仪于波长450 nm处测定A值, 根据标准曲线计算共培养体系细胞培养上清液中IFN-γ和TNF-α水平。

1.8 LDH释放法检测各组CD8+T淋巴细胞杀伤力 以SK-OV-3细胞为靶细胞, CD8+T淋巴细胞为效应细胞, 将其分为靶细胞自然释放组(100 μL

SK-OV-3 细胞悬液 + 100 μ L 细胞培养液)、效应细胞自然释放组 (100 μ L CD8+T 淋巴细胞悬液 + 100 μ L 细胞培养液)、自然杀伤组 (100 μ L CD8+T 淋巴细胞悬液 + 100 μ L SK-OV-3 细胞悬液, 即上述共培养体系) 和靶细胞最大释放组 (100 μ L SK-OV-3 细胞悬液 + 10 μ L LDH 释放试剂 + 90 μ L 细胞培养液)。37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 离心收集 120 μ L 细胞培养上清液, 加入 60 μ L LDH 检测液, 室温避光孵育 30 min。采用酶标仪于波长 490 nm 处测定 A 值, 计算 CD8+T 淋巴细胞杀伤力。CD8+T 淋巴细胞杀伤力 = (自然杀伤组 A 值 - 靶细胞自然释放组 A 值 - 效应细胞自然释放组 A 值) / (靶细胞最大释放组 A 值 - 靶细胞自然释放组 A 值) \times 100%。

1.9 RT-qPCR 法检测各组 SK-OV-3 细胞中 TIM 和 PD-L1 mRNA 表达水平 收集 BC 组、si-NC 组和 si-TIM 组 SK-OV-3 细胞, 加入 TRIzol 试剂进行裂解并提取细胞总 RNA。使用逆转录试剂盒获取 cDNA, 以 cDNA 为模板, 采用 SYBR Green Master Mix 配置 PCR 反应体系, 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s、60 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。引物序列: TIM 上游引物 5'-GTTTTGGCAATCTGCCAAGGA-3', TIM 下游引物 5'-GCAGCTCATAACAAGTTTCACT-3'; PD-L1 上游引物 5'-TTTGCTGAACGCCCATATA-3', PD-L1 下游引物 5'-TGCTTGTCAGATGACTTCG-3'; GAPDH 上游引物 5'-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3', GAPDH 下游引物 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'。以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算细胞中 TIM 和 PD-L1 mRNA 表达水平。

1.10 Western blotting 法检测各组 SK-OV-3 细胞中 TIM 和 PD-L1 蛋白表达水平 收集各组转染后的 SK-OV-3 细胞, 加入 RIPA 裂解液提取蛋白质。蛋白质浓度定量后, 经 SDS-PAGE 电泳分离, 将蛋白转移至 PVDF 膜上。使用含 5% 脱脂奶粉封闭液浸泡 PVDF 膜, 室温封闭 2 h。加入 TIM 抗体 (1:10 000)、PD-L1 抗体 (1:1 000) 和 GAPDH 抗体 (1:2 500) 浸泡 PVDF 膜, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入二抗室温孵育 1 h, 最后加入化学发光试剂进行显影曝光。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋

白条带灰度值。

1.11 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析。各组 SK-OV-3 细胞存活率和细胞凋亡率, 细胞表面 PD-L1 阳性表达率, 共培养体系细胞培养上清液中 IFN- γ 和 TNF- α 水平及 CD8+T 淋巴细胞杀伤力, 细胞中 TIM 和 PD-L1 mRNA 及蛋白表达水平, 均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人外周血 CD8+T 淋巴细胞鉴定 免疫磁珠法分离前, 人外周血中 CD8+T 淋巴细胞 (CD3+/CD8+) 亚群比例为 24.43% \pm 2.76%; 免疫磁珠法分离后, CD8+T 淋巴细胞 (CD3+/CD8+) 亚群比例为 96.56% \pm 0.59%, 提示所提取 CD8+T 淋巴细胞的纯度较高。见图 1。

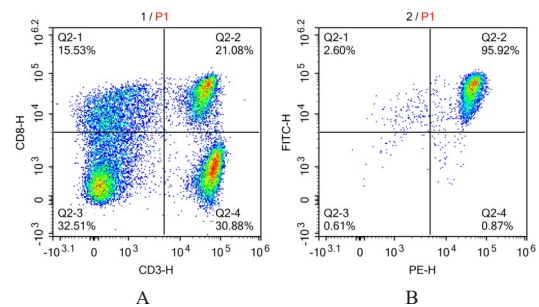
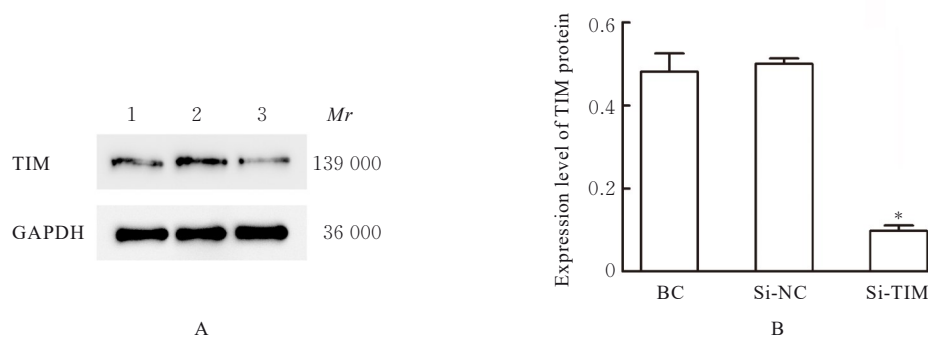


图 1 流式细胞术检测免疫磁珠法分离前(A)后(B) CD3+/CD8+T 淋巴细胞亚群比例

Fig. 1 Proportions of CD3+/CD8+T lymphocyte cell subsets before (A) and after (B) separated immune with magnetic bead method detected by flow cytometry

2.2 各组 SK-OV-3 细胞中 TIM mRNA 和蛋白表达水平 与 BC 组 (1.00 \pm 0.08) 比较, si-NC 组细胞中 TIM mRNA (0.97 \pm 0.05) 和蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), si-TIM 组细胞中 TIM mRNA (0.26 \pm 0.08) 和蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$), 提示本研究成功获得 TIM 基因沉默的卵巢癌 SK-OV-3 细胞。见图 2。

2.3 各组 SK-OV-3 细胞存活率 与 BC 组 (100.00% \pm 10.44%) 比较, BC/T 组 SK-OV-3 细胞存活率 (79.69% \pm 3.23%) 明显降低 ($P < 0.01$); 与 BC/T 组比较, si-NC/T 组 SK-OV-3 细胞存活率 (80.17% \pm 5.47%) 差异无统计学意义 ($P >$



Lane 1: BC group; Lane 2: Si-NC group; Lane 3: Si-TIM group. * $P < 0.01$ vs BC group.

图2 Western blotting法检测各组SK-OV-3细胞中TIM蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 2 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expression of TIM protein in SK-OV-3 cells in various groups detected by Western blotting method

0.05), si-TIM/T组SK-OV-3细胞存活率(47.94%±3.94%)明显降低($P < 0.01$)。

与BC/T组(100.00%±5.46%)比较, si-NC+oe-NC/T组SK-OV-3细胞存活率(98.38%±2.92%)差异无统计学意义($P > 0.05$), si-TIM/T组SK-OV-3细胞存活率(61.13%±4.44%)明显降低($P < 0.01$); 与si-TIM/T组比较, si-TIM+oe-PD-L1/T组SK-OV-3细胞存活率(87.52%±4.16%)明显升高($P < 0.01$)。

2.4 各组SK-OV-3细胞凋亡率 与BC组(4.41%±0.57%)比较, BC/T组SK-OV-3细胞凋亡率(15.29%±1.03%)明显升高($P < 0.01$); 与BC/T组比较, si-NC/T组SK-OV-3细胞凋亡率(15.77%±0.94%)差异无统计学意义($P > 0.05$), si-TIM/T组SK-OV-3细胞凋亡率(24.71%±1.51%)明显升高($P < 0.01$)。见图3。

与BC/T组(15.47%±0.84%)比较, si-NC+oe-NC/T组SK-OV-3细胞凋亡率(14.93%±1.04%)差异无统计学意义($P > 0.05$), si-TIM/T组SK-OV-3细胞凋亡率(25.73%±1.41%)明显升高($P < 0.01$); 与si-TIM/T组比较, si-TIM+oe-PD-L1/T组SK-OV-3细胞凋亡率(17.43%±0.92%)明显降低($P < 0.01$)。见图4。

2.5 各组SK-OV-3细胞表面PD-L1蛋白阳性表达率 与BC组(44.10%±1.79%)比较, si-NC组SK-OV-3细胞表面PD-L1蛋白阳性表达率(43.08%±2.15%)差异无统计学意义($P > 0.05$), si-TIM组SK-OV-3细胞表面PD-L1蛋白阳性表达率(21.16%±2.45%)明显降低($P < 0.01$)。见图5。

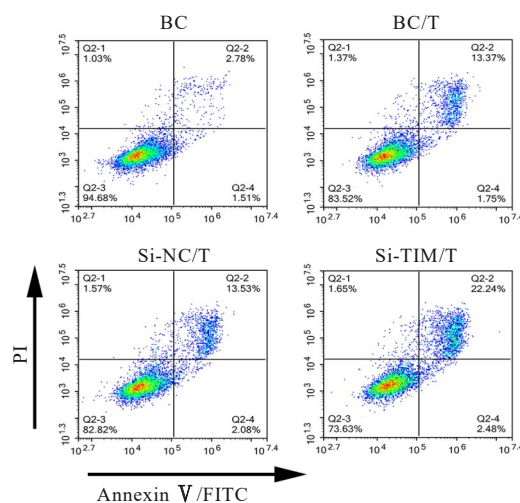


图3 流式细胞术检测转染si-NC和si-TIM后各组SK-OV-3细胞凋亡率

Fig. 3 Apoptotic rates of SK-OV-3 cells in various groups after transfected with si-NC and si-TIM detected by flow cytometry

2.6 各组共培养体系细胞上清液中IFN- γ 和TNF- α 水平 与BC/T组比较, si-NC/T组细胞培养上清液中IFN- γ 和TNF- α 水平差异无统计学意义($P > 0.05$), si-TIM/T组细胞上清液中IFN- γ 和TNF- α 水平明显升高($P < 0.01$)。见表1。

与BC/T组比较, si-NC+oe-NC/T组细胞培养上清液中IFN- γ 和TNF- α 水平差异无统计学意义($P > 0.05$), si-TIM/T组细胞培养上清液中IFN- γ 和TNF- α 水平明显升高($P < 0.01$)。与si-TIM/T组比较, si-TIM+oe-PD-L1/T组细胞培养上清液中IFN- γ 和TNF- α 水平明显降低($P < 0.01$)。见表2。

2.7 各组CD8+T淋巴细胞杀伤力 与BC/T组

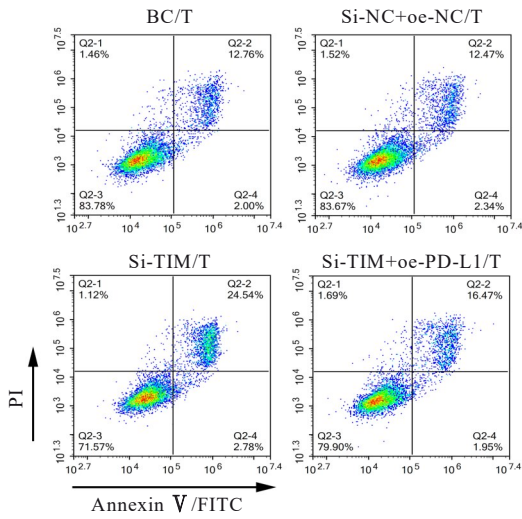


图4 流式细胞术检测转染 oe-NC 和 oe-PD-L1 后各组 SK-OV-3 细胞凋亡率

Fig. 4 Apoptotic rates of SK-OV-3 cells in various groups after transfected with oe-NC and oe-PD-L1 detected by flow cytometry

(13.97%±1.19%) 比较, si-NC/T 组 CD8+T 淋巴细胞杀伤力 (14.19%±2.34%) 差异无统计学

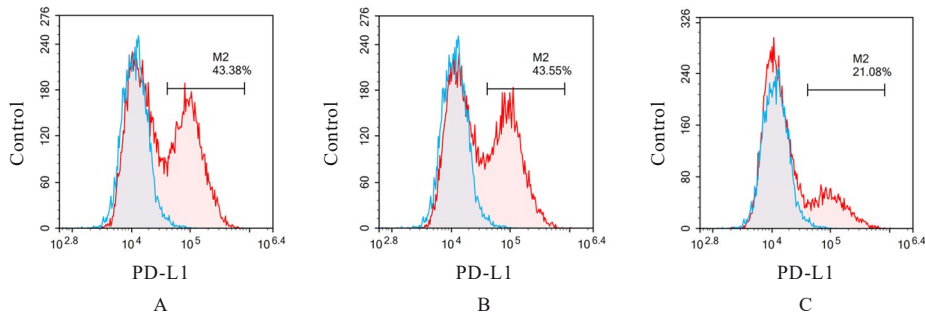
意义 ($P>0.05$), si-TIM/T 组 CD8+T 淋巴细胞杀伤力 (22.67%±1.49%) 明显增强 ($P<0.01$)。

与 BC/T 组 (14.27%±1.94%) 比较, si-NC+oe-NC/T 组 CD8+T 淋巴细胞杀伤力 (14.14%±0.87%) 差异无统计学意义 ($P>0.05$), si-TIM/T 组 CD8+T 淋巴细胞杀伤力 (23.72%±1.00%) 明显增强 ($P<0.01$); 与 si-TIM/T 组比较, si-TIM+oe-PD-L1/T 组 CD8+T 淋巴细胞杀伤力 (18.32%±1.37%) 明显减弱 ($P<0.01$)。

2.8 各组 SK-OV-3 细胞中 PD-L1 mRNA 和蛋白表达水平

与 BC 组 (1.01±0.13) 比较, si-NC 组 SK-OV-3 细胞中 PD-L1 mRNA (1.04±0.08) 和蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$), si-TIM 组 SK-OV-3 细胞中 PD-L1 mRNA (0.56±0.09) 和蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.01$)。见图 6。

与 BC 组比较, si-NC+oe-NC 组 SK-OV-3 细胞中 PD-L1 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>$



A: BC group; B: Si-NC group; C: Si-TIM group.

图5 流式细胞术检测各组 SK-OV-3 细胞表面 PD-L1 蛋白阳性表达率

Fig. 5 Positive expression rates of PD-L1 on surface of SK-OV-3 cells in various groups detected by flow cytometry

表1 ELISA 法检测转染 si-NC 和 si-TIM 后各组共培养体系细胞培养上清液中 IFN-γ 及 TNF-α 水平

Tab. 1 Levels of IFN-γ and TNF-α in supernatant of co-culture system cells in various groups after transfected with si-NC and si-TIM detected by ELISA method
[n=3, $\bar{x}\pm s$, $\rho_B/(\text{ng}\cdot\text{L}^{-1})$]

Group	IFN-γ	TNF-α
BC/T	72.63±6.16	103.79±9.71
Si-NC/T	68.71±9.57	108.86±9.29
Si-TIM/T	133.32±9.91*	202.29±14.00*

* $P<0.01$ vs BC/T group.

表2 ELISA 法检测转染 oe-NC 和 oe-PD-L1 后各组共培养体系细胞培养上清液中 IFN-γ 及 TNF-α 水平

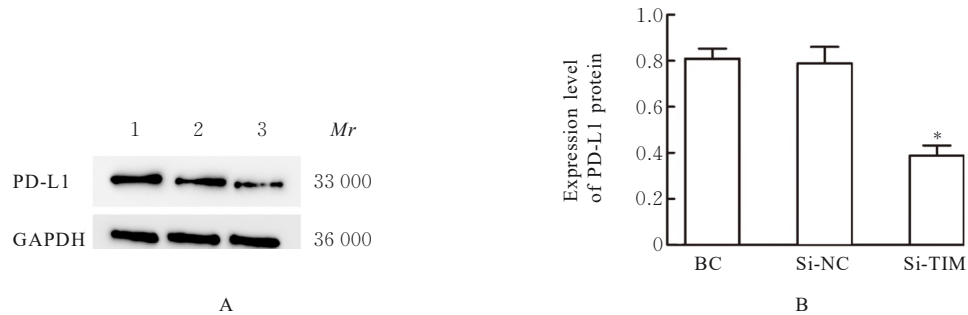
Tab. 2 Levels of IFN-γ and TNF-α in supernatant of co-culture system cells in various groups after transfected with oe-NC and oe-PD-L1 detected by ELISA method
[n=3, $\bar{x}\pm s$, $\rho_B/(\text{ng}\cdot\text{L}^{-1})$]

Group	IFN-γ	TNF-α
BC/T	72.89±4.55	106.78±6.01
Si-NC+oe-NC/T	74.03±6.13	109.44±10.03
Si-TIM/T	134.83±11.28*	209.53±9.59*
Si-TIM+oe-PD-L1/T	92.57±4.25 [△]	153.55±8.23 [△]

* $P<0.01$ vs BC/T group; [△] $P<0.01$ vs si-TIM/T group.

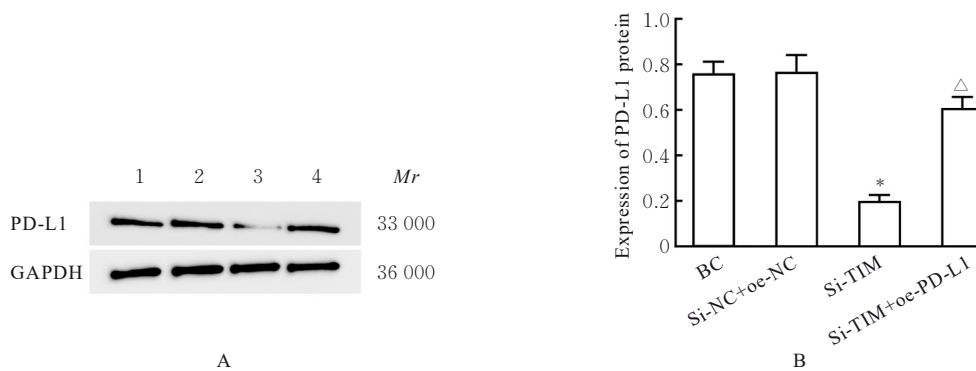
0.05), si-TIM组细胞中PD-L1蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与 si-TIM组比较, si-TIM+

oe-PD-L1组细胞中PD-L1蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。见图7。



Lane 1: BC group; Lane 2: Si-NC group; Lane 3: Si-TIM group. * $P < 0.01$ vs BC group.

图6 Western blotting法检测转染 si-NC 和 si-TIM 后各组 SK-OV-3 细胞中 PD-L1 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)
Fig. 6 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of PD-L1 protein in SK-OV-3 cells in various groups after transfected with si-NC and si-TIM detected by Western blotting method



Lane 1: BC group; Lane 2: Si-NC+oe-NC group; Lane 3: Si-TIM group; Lane 4: Si-TIM oe-PD-L1 group. * $P < 0.01$ vs BC group; $\Delta P < 0.01$ vs si-TIM group.

图7 Western blotting法检测转染 oe-NC 和 oe-PD-L1 后各组 SK-OV-3 细胞中 PD-L1 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)
Fig. 7 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of PD-L1 protein in SK-OV-3 cells in various groups after transfected with oe-NC and oe-PD-L1 detected by Western blotting method

3 讨论

肿瘤免疫逃逸已成为肿瘤治疗的最大障碍之一, 深入了解肿瘤免疫逃逸机制是进一步完善临床治疗策略的关键^[12]。T淋巴细胞是适应性免疫系统的基础, 然而由幼稚T淋巴细胞分化为功能性效应CD8+T淋巴细胞需要通过主要组织相容性复合物分子、共刺激和细胞因子呈递的抗原结合T淋巴细胞受体信号才能有效启动。研究^[13]显示: 在细胞因子刺激后, T淋巴细胞与肿瘤细胞的相互作用更强。IL-2等细胞因子可增强T淋巴细胞肿瘤免疫能力^[14]。CD8+T淋巴细胞是肿瘤免疫的最终效应物, 大部分形式的有效肿瘤免疫疗法均涉及CD8+T淋巴细胞的效应功能^[14-15]。研究^[16-18]

显示: 促进CD8+T淋巴细胞对癌细胞的杀伤作用有助于抑制肿瘤免疫逃逸。本研究结果显示: SK-OV-3细胞存活率降低, 细胞凋亡率升高, 提示活化的CD8+T淋巴细胞具有明显的抗肿瘤作用。若进一步增强CD8+T淋巴细胞的杀伤作用, 将可能发挥更强大的肿瘤免疫功能。

昼夜节律是影响真核生物和原核生物生理的一个基本生物学过程, 昼夜节律紊乱可能增加患肿瘤风险, 并影响癌症患者对治疗的反应^[19]。生物节律基因表达失调在恶性肿瘤的发生发展中起重要作用^[20]。TIM基因因其参与生物节律和细胞周期而被广泛研究, 该基因与多种恶性肿瘤的发展及预后存在关联, 可能是泛癌患者的前瞻性预后和免疫生

物标志物^[21]。研究^[22]显示：*TIM*基因在宫颈癌中高表达，调节细胞增殖和顺铂敏感性，敲除*TIM*基因可诱导细胞凋亡和细胞衰老。但关于*TIM*基因表达与肿瘤免疫逃逸之间关系的研究较少。DONG等^[11]研究发现：癌细胞中的*TIM*基因可通过抑制CD8+T淋巴细胞浸润和免疫活性参与免疫抑制。肿瘤微环境中的CD8+T淋巴细胞被激活后分泌IL-2、IFN- γ 和TNF- α 等细胞因子，并在肿瘤微环境中传播，参与肿瘤免疫反应^[23]。本研究结果显示：SK-OV-3细胞中*TIM*基因沉默后，与之共培养的CD8+T淋巴细胞分泌的IFN- γ 和TNF- α 水平升高，且CD8+T淋巴细胞对SK-OV-3细胞杀伤力也明显增强。*TIM*基因沉默后进一步抑制SK-OV-3细胞增殖，促进细胞凋亡，提示沉默*TIM*基因可抑制卵巢癌细胞免疫逃逸，但具体机制还需进一步明确。

PD-L1是一个被广泛研究的免疫检查点，通过抑制CD8+T淋巴细胞的免疫活性，在促进恶性肿瘤的免疫逃逸中发挥重要作用^[24-25]。PD-1主要由CD4+和CD8+T淋巴细胞表达，其配体PD-L1广泛表达于各种细胞，包括肿瘤细胞。阻断PD-L1/PD-1信号通路可能有助于恢复T淋巴细胞介导的抗肿瘤免疫，因此，PD-L1/PD-1可能是卵巢癌的重要治疗靶点^[26]。然而，目前针对PD-L1/PD-1信号通路的抗体并未表现出较好的临床疗效，其有效率仅为10%~15%^[27]。与单一治疗比较，免疫检查点抑制剂与小分子抑制剂的联合治疗显示出更好的疗效^[28]。研究^[29]显示：沉默卵巢癌细胞中*PD-L1*基因的表达后，肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显减弱。而高表达*TIM*基因会增强肿瘤细胞中*PD-L1*基因表达水平^[11]。本研究结果显示：沉默*TIM*基因后卵巢癌SK-OV-3细胞中*PD-L1*基因表达下调，SK-OV-3细胞中*PD-L1*基因过表达会部分抑制*TIM*基因沉默对CD8+T淋巴细胞杀伤力及细胞因子分泌的促进作用，同时也逆转了*TIM*基因沉默对SK-OV-3细胞增殖和凋亡的影响，提示*TIM*基因沉默可能通过下调*PD-L1*基因表达抑制SK-OV-3细胞免疫逃逸。

综上所述，*TIM*基因沉默可通过调节*PD-L1*基因表达抑制卵巢癌细胞免疫逃逸，从而抑制细胞增殖，并诱导细胞凋亡。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

顾雨玲参与统计学分析和论文撰写，郑翠参与实验操作，汤云仙参与论文选题和实验方案设计。

[参考文献]

- [1] SONG J, SOKOLL L J, ZHANG Z, et al. VCAM-1 complements CA-125 in detecting recurrent ovarian cancer[J]. Clin Proteomics, 2023, 20(1): 25.
- [2] LAMPROPOULOU D I, PAPANIMITRIOU M, PAPANIMITRIOU C, et al. The role of EMT-related lncRNAs in ovarian cancer[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(12): 10079.
- [3] PREETAM S, MONDAL S, PRIYA S, et al. Targeting tumour markers in ovarian cancer treatment[J]. Clin Chim Acta, 2024, 559: 119687.
- [4] YIN S S, GAO F H. Molecular mechanism of tumor cell immune escape mediated by CD24/siglec-10 [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1324.
- [5] JIANG X J, WANG J, DENG X Y, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 10.
- [6] CAI Y D, CHIU J C. Timeless in animal circadian clocks and beyond[J]. FEBS J, 2022, 289(21): 6559-6575.
- [7] VIPAT S, MOISEEVA T N. The TIMELESS roles in genome stability and beyond[J]. J Mol Biol, 2024, 436(1): 168206.
- [8] COLANGELO T, CARBONE A, MAZZARELLI F, et al. Loss of circadian gene Timeless induces EMT and tumor progression in colorectal cancer *via* Zeb1-dependent mechanism[J]. Cell Death Differ, 2022, 29(8): 1552-1568.
- [9] XING X, GU F, HUA L Y, et al. TIMELESS promotes tumor progression by enhancing macrophages recruitment in ovarian cancer [J]. Front Oncol, 2021, 11: 732058.
- [10] 栗连秀, 陈静平, 杨达平, 等. 沉默生物钟基因Timeless对卵巢癌SKOV3细胞凋亡和侵袭能力的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(7): 1169-1175.
- [11] DONG X R, DAI H J, LIN Y P, et al. TIMELESS upregulates PD-L1 expression and exerts an immunosuppressive role in breast cancer [J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 400.
- [12] AKTAR N, CHEN Y T, ABBAS M, et al. Understanding of immune escape mechanisms and advances in cancer immunotherapy [J]. J Oncol, 2022, 2022: 8901326.
- [13] SAVID-FRONTERA C, VIANO M E, BAEZ N S,

- et al. Exploring the immunomodulatory role of virtual memory CD8⁺T cells: Role of IFN gamma in tumor growth control[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 971001.
- [14] GILES J R, GLOBIG A M, KAECH S M, et al. CD8⁺T cells in the cancer-immunity cycle [J]. *Immunity*, 2023, 56(10): 2231-2253.
- [15] QIN Y Y, BAO X Y, ZHENG M Z. CD8⁺T-cell immunity orchestrated by iNKT cells [J]. *Front Immunol*, 2023, 13: 1109347.
- [16] WANG X M, ZHANG Y, ZHENG J, et al. LncRNA UCA1 attenuated the killing effect of cytotoxic CD8⁺T cells on anaplastic thyroid carcinoma *via* miR-148a/PD-L1 pathway [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(8): 2235-2245.
- [17] 杨婷, 郑锦秀, 高书华, 等. 钙连蛋白(CNX)通过促进MHC I表达增强CD8⁺T细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2022, 38(2): 97-102.
- [18] QIN R, ZHAO C, WANG C J, et al. Tryptophan potentiates CD8⁺T cells against cancer cells by TRIP12 tryptophanylation and surface PD-1 downregulation[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(7): e002840.
- [19] CHANG W H, LAI A G. Timing gone awry: distinct tumour suppressive and oncogenic roles of the circadian clock and crosstalk with hypoxia signalling in diverse malignancies[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 132.
- [20] GAO Y Y, WU Y W, ZHANG N M, et al. *IDH1* gene mutation activates Smad signaling molecules to regulate the expression levels of cell cycle and biological rhythm genes in human glioma U87-MG cells [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5): 354.
- [21] YANG Y C, TANG X Z, LIN Z J, et al. An integrative evaluation of circadian gene TIMELESS as a pan-cancer immunological and predictive biomarker[J]. *Eur J Med Res*, 2023, 28(1): 563.
- [22] ZHOU J H, ZHANG Y H, ZOU X W, et al. Aberrantly expressed timeless regulates cell proliferation and cisplatin efficacy in cervical cancer [J]. *Hum Gene Ther*, 2020, 31(5/6): 385-395.
- [23] HOEKSTRA M E, VIJVER S V, SCHUMACHER T N. Modulation of the tumor micro-environment by CD8⁺T cell-derived cytokines [J]. *Curr Opin Immunol*, 2021, 69: 65-71.
- [24] ZHU D, XU R D, HUANG X P, et al. Deubiquitinating enzyme OTUB1 promotes cancer cell immunosuppression *via* preventing ER-associated degradation of immune checkpoint protein PD-L1 [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(6): 1773-1789.
- [25] CHA J H, YANG W H, XIA W Y, et al. Metformin promotes antitumor immunity *via* endoplasmic-reticulum-associated degradation of PD-L1 [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(4): 606-620.e7.
- [26] DUMITRU A, DOBRICA E C, CROITORU A, et al. Focus on PD-1/PD-L1 as a therapeutic target in ovarian cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12067.
- [27] CHARDIN L, LEARY A. Immunotherapy in ovarian cancer: thinking beyond PD-1/PD-L1 [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 795547.
- [28] KHATOON E, PARAMA D, KUMAR A, et al. Targeting PD-1/PD-L1 axis as new horizon for ovarian cancer therapy [J]. *Life Sci*, 2022, 306: 120827.
- [29] CHEN J X, YI X J, GAO S X, et al. The possible regulatory effect of the PD-1/PD-L1 signaling pathway on Tregs in ovarian cancer [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2020, 39(4): 319-330.