

DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20230807.002

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20230807.1550.004

m⁶A 修饰促进宫颈癌的增殖和迁移并调控 PD-L1 表达

杨京蕊,夏娜娜,余敏敏✉

(南京中医药大学附属南京医院妇科,江苏南京 210003)

[摘要] 目的:探索 N⁶-甲基腺嘌呤 (m⁶A) 修饰相关基因甲基转移酶 14 (METTL14) 和 YTH 结构域家族蛋白 1 (YTHDF1) 对宫颈癌细胞增殖、迁移和凋亡能力的影响,并探讨其与细胞程序性死亡-配体 1 (PD-L1) 表达的相关性。方法:通过免疫组织化学技术分析 METTL14、YTHDF1 和 PD-L1 在宫颈癌组织和正常宫颈组织中的表达水平。采用小干扰 RNA (si-RNA) 敲低宫颈癌细胞中 METTL14、YTHDF1 基因的表达,实时荧光定量 PCR (qPCR) 验证敲低效果。敲低 METTL14、YTHDF1 后,CCK-8 实验检测细胞增殖能力,Transwell 实验检测细胞迁移能力,流式细胞术检测细胞凋亡情况,qPCR 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 PD-L1 mRNA 和蛋白表达。结果:免疫组化结果显示,METTL14、YTHDF1 和 PD-L1 在宫颈癌组织中高表达。敲低 METTL14 和 YTHDF1 基因表达后,宫颈癌细胞的增殖和迁移能力明显抑制,凋亡增加,PD-L1 mRNA 和蛋白表达水平也随之下调。结论:m⁶A 甲基化修饰可通过调控宫颈癌细胞中 PD-L1 的表达来影响宫颈癌细胞的增殖、迁移和凋亡。

[关键词] 宫颈癌;PD-L1;m⁶A;增殖;迁移;凋亡

[中图分类号] R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2023)19-1465-07

m⁶A modification promotes the proliferation and migration of cervical cancer and regulates the expression of PD-L1

YANG Jing-rui, XIA Na-na, YU Min-min ✉

(Department of Gynaecology, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210003, China)

[Foundation Project]: This study was supported by National Natural Science Foundation of China (81472431); Jiangsu Provincial Medical Key Talent Fund (ZDRCA2016072); Natural Science Foundation of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine (XZR2020070)

[Author]: YANG Jing-rui, E-mail: yjrui7@163.com.

[Correspondence to]: YU Min-min, Chief Physician, Doctoral Supervisor, E-mail: njyy022@njucm.edu.cn.

Received: 2023-05-17

Revised: 2023-08-04

JHMU, 2023;29(19):1465-1471

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the effects of N⁶-methyladenosine (m⁶A) modification-related genes methyltransferase 14 (METTL14) and YTH domain family protein 1 (YTHDF1) on the proliferation, migration and apoptosis capacity of cervical cancer cells, and to explore their correlation with programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression. **Methods:** The expression levels of METTL14, YTHDF1 and PD-L1 in cervical cancer and normal cervical tissues were analyzed by immunohistochemical techniques. Small interfering RNA (si-RNA) was used to knock down the expression of METTL14 and YTHDF1 genes in cervical cancer cells, and the knockdown effect was detected by real-time PCR (qPCR). After knocking down METTL14 and YTHDF1, CCK-8 assays detected cell proliferation, Transwell assays detected cell migration capacity, flow cytometry assays detected apoptosis, and qPCR and Western blot detected PD-L1 mRNA and protein expression. **Results:** The immunohistochemical results showed that METTL14, YTHDF1 and PD-L1 were highly expressed in cervical cancer tissues. After knocking down the expression of METTL14 and YTHDF1 genes, the proliferation and migration ability of cervical cancer cells was significantly inhibited, apoptosis increased, and the expression level of PD-L1 mRNA and protein was also down-regulated. **Conclusion:** m⁶A

[基金项目] 国家自然科学基金(81472431);江苏省医学重点人才基金(ZDRCA2016072);南京中医药大学自然科学基金(XZR2020070)

[作者简介] 杨京蕊, E-mail: yjrui7@163.com。

[通讯作者] 余敏敏, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: njyy022@njucm.edu.cn。

[收稿日期] 2023-05-17

[修回日期] 2023-08-04

网络出版时间: 2023-08-08 09:20:33

methylation modification may affect the proliferation, migration and apoptosis of cervical cancer cells by regulating the expression of PD-L1 in cervical cancer cells.

[KEYWORDS] Cervical cancer; PD-L1; m⁶A; Proliferation; Migration; Apoptosis

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,严重危害着女性的生命健康。2020年中国宫颈癌新发病例近11万,死亡病例近6万,分别约占全球发病和死亡总数的18.3%和17.6%,且患者年龄具有年轻化倾向^[1]。2022年美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)公布的宫颈癌临床实践指南指出,中晚期宫颈癌的一线治疗首选放化疗,PD-L1阳性(CPS \geq 1)或MSI-H/dMMR的持续性或复发转移性宫颈癌患者一线联合化疗首选程序性死亡受体1(PD-1)抑制剂派姆单抗+顺铂(卡铂)+紫杉醇+贝伐单抗(证据等级1)^[2]。肿瘤的免疫治疗已逐渐成为宫颈癌治疗的研究热点,但单独使用PD-1抑制剂的总体缓解率仅20%左右^[3],因此,探索更为有效的免疫联合治疗手段和免疫治疗应答生物标志物对宫颈癌的治疗尤为重要。

N6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine, m⁶A)修饰是一种基因调控机制,异常m⁶A修饰水平的变化会导致一系列癌症的发生,包括宫颈癌、子宫内膜癌、鳞状细胞癌等^[4]。m⁶A修饰普遍存在于真核生物中,研究发现m⁶A修饰的动态调控与基因表达显著相关,有可能通过其他途径影响PD-L1的表达^[5]。甲基转移酶蛋白3(methyltransferase-like 3, METTL3)在近终止密码子区域介导PD-L1 mRNA的m⁶A甲基化修饰,从而调控PD-L1的表达并维持基因的稳定^[6]。此外,研究通过分析癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据集中的306例宫颈癌患者的临床信息和转录组数据,发现m⁶A修饰模式与免疫治疗应答密切相关,对于宫颈癌的发生和进展具有重要影响^[7]。目前,m⁶A修饰在宫颈癌发生发展中的关键作用研究不足,与PD-L1表达的相关性研究尚未有报道。因此,本研究拟观察m⁶A修饰相关基因和PD-L1在宫颈癌组织中的表达情况,并探索其对宫颈癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响,及其与PD-L1表达的相关性,进一步发现相关分子机制,为宫颈癌的免疫联合治疗和有效的免疫治疗应答生物标志物提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 一般材料

SiHa细胞(中国上海科学院细胞库);胎牛血清

(Gibco公司);Rfect转染试剂、si-METTL14(序列为5'-CCGACAGCAUUGGUGCCGUGUAAA-3')、si-YTHDF1(序列为5'-CCUACGGACAG-CUCAGUAA-3')、si-NC(序列为5'-UUCUCC-GAACGUGUCACGUdTdT-3')、CCK-8试剂盒、PCR引物(#YWSJ)、超灵敏化学发光检测试剂盒(均购自南京普诺恩生物科技有限公司);RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒(#R333-01)、定量PCR检测试剂盒(#Q711-02)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(均购自诺唯赞生物科技有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司);蛋白Marker(#01120923)(Thermo公司);兔抗METTL14 Rabbit pAb(#26158-1-AP)、YTHDF1 Rabbit pAb(#17479-1-AP)、PD-L1/CD274 Rabbit pAb(#28076-1-AP)、GAPDH Rabbit pAb(#KK1102)(均购自ProteinTech公司);HRP Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(#AS014)(ABclonal公司);柠檬酸抗原修复液(#C1032)、兔血清(#SL034)、DAB显色试剂盒(#DA1010)(均购自北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 将正常宫颈组织和宫颈癌组织依次进行石蜡切片脱蜡至水,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,兔抗METTL14单克隆抗体(1:300)、兔抗YTHDF1单克隆抗体(1:300)、PD-L1单克隆抗体(1:200)孵育过夜,次日HRP标记的山羊抗兔IgG(1:2000)室温孵育50 min,DAB显色,苏木素复染,中性树胶脱水封片,结果判读(苏木素染细胞核为蓝色,DAB显出的阳性表达为棕黄色)。

1.2.2 SiHa细胞培养和转染 SiHa宫颈癌细胞用含10%胎牛血清和1%双抗的完全培养基培养,置于37℃,含5%CO₂的培养箱中。转染前一天,取经过两次传代以上的处于对数生长期的SiHa细胞接种于6孔板,待细胞达到约50%的融合度时,按照转染试剂说明书步骤进行小干扰RNA(si-METTL14、si-YTHDF1、si-NC)的转染,分为实验组(si-METTL14、si-YTHDF1)和对照组(si-NC),放入培养箱培养48 h进行RNA水平检测,培养72 h进行蛋白水平检测。

1.2.3 CCK-8法检测SiHa细胞的活力 取转染后

处于对数生长期的 SiHa 细胞,包括 si-METTL14、si-YTHDF1 实验组(已分别培养 0、24、48、72、96 h)和 si-NC 对照组分别计数,调整细胞浓度为 3×10^4 个/mL,用排枪按 100 μ L 细胞悬液/孔接种于 96 孔板中,每组细胞设置 3 个复孔,放入 37 $^{\circ}$ C,含 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续避光孵育 3 h,酶标仪下测定 450 nm 波长处各孔吸光度。然后利用 GraphPad Prism 8.0.2 软件,以时间(h)为横轴,细胞活力(OD450)值为纵轴,绘制生长曲线。

1.2.4 qPCR 法检测 METTL14、YTHDF1 和 PD-L1 mRNA 的表达 取转染后的 SiHa 细胞,按照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,酶标仪中测量所提取 RNA 的浓度和纯度后进行逆转录,然后根据定量 PCR 检测试剂盒说明进行 PCR 反应。以 GAPDH 作为内参基因,其上游引物为 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物为 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'; METTL14 上游引物为 5'-AGTGCCGACAGCATTG-GTG-3',下游引物为 5'-GGAGCAGAGGTAT-CATAGGAAGC-3'; YTHDF1 上游引物为 5'-ACCTGTCCAGCTATTACCCG-3',下游引物为 5'-TGGTGAGGTATGGAATCGGAG-3',PD-L1 上游引物为 5'-GCTGCACTAATTGTCTATTGG-GA-3',下游引物为 5'-AATTCGCTTGTAGTCG-GCACC-3'。

1.2.5 Western blot 法检测 METTL14、YTHDF1 和 PD-L1 蛋白的表达 从培养箱取出转染后的 SiHa 细胞,用按 100:1 比例配制的 RIPA 裂解液与 PMSF 的混合液裂解细胞,提取总蛋白,根据 BCA 蛋白试剂盒定量蛋白浓度后进行归一化,然后在 100 $^{\circ}$ C 高温下对所提蛋白进行加热变性。设置恒压 150 V 电泳 90 min 左右,至溴酚蓝跑出胶的底端停止电泳,用 250 mA 电流转膜 1 h,5% 脱脂牛奶封闭 1 h。然后在 PVDF 膜上滴加兔抗 METTL14 单克隆抗体(1:1 500),兔抗 YTHDF1 单克隆抗体(1:4 000),兔抗 PD-L1 单克隆抗体(1:600),兔抗 GAPDH 单克隆抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。次日, TBST 清洗掉一抗,在 PVDF 膜上继续滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(H+L)(1:5 000),室温孵育 1 h,洗膜。最后,配制超敏 ECL 化学发光液,在化学发光成像系统上进行显影成像,并采集图像。

1.2.6 Transwell 实验检测 SiHa 细胞的迁移能力 取转染后的实验组(si-METTL14、si-YTHDF1)和

对照组(si-NC)细胞,用胰蛋白酶消化,重悬计数,调整细胞密度为 3×10^5 个细胞/mL,加入 200 μ L 于 Transwell 小室的上室中,再加入 600 μ L 含 20% FBS 的 DMEM 培养基于下室中,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,用干燥医用棉签擦去小室内未迁移的细胞,加入 4% 多聚甲醛溶液常温固定 20 min,再加入结晶紫溶液常温避光染色 15 min,PBS 清洗,待自然风干后,置于显微镜下拍照,并用 ImageJ 软件进行定量,GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据分析及绘图。

1.2.7 流式细胞术检测 SiHa 细胞的凋亡情况 取实验组(si-METTL14、si-YTHDF1)和对照组(si-NC)细胞经胰酶消化,预冷的 PBS 洗 2 遍,离心,加入适量体积 $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞,计数,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。设置实验组(空白管、FITC 单染管、PI 单染管、FITC-PI 双染管)和对照组(空白管、FITC-PI 双染管),每管均加 100 μ L 细胞悬液,单染管分别加入 5 μ L FITC 和 5 μ L PI,双染管同时加入 5 μ L FITC 和 5 μ L PI,室温避光孵育 15 min,结束后再次加入 400 μ L $1 \times$ Binding Buffer 到 5 mL 流式管,充分混匀,在流式细胞分析仪上检测细胞凋亡情况,最后用 FlowJo 10 进行结果分析。

2 结果

2.1 METTL14、YTHDF1、PD-L1 在宫颈癌组织中高表达

通过对宫颈癌组织和正常宫颈组织进行免疫组化染色,结果发现,相比于正常宫颈组织,8 例宫颈癌样本中的 METTL14、YTHDF1、PD-L1 均显著高表达。见图 1。

2.2 敲低 METTL14、YTHDF1 抑制 SiHa 细胞活性

为了研究 METTL14 和 YTHDF1 在宫颈癌中的作用,在 SiHa 细胞中敲低 METTL14 和 YTHDF1 的表达,同时转染阴性对照和荧光转染对照,荧光电子显微镜观察转染效率(图 2A),并通过 qPCR 法进一步验证敲低效果($P < 0.05$,图 2B)。敲低 METTL14 和 YTHDF1 后,CCK-8 实验检测 METTL14 和 YTHDF1 对 SiHa 细胞生长的影响,结果表明,敲低 METTL14 和 YTHDF1 表达后,SiHa 细胞的活性显著降低($P < 0.05$,图 2C)。

2.3 敲低 METTL14、YTHDF1 抑制 SiHa 细胞的迁移

进一步探究 METTL14、YTHDF1 对宫颈癌细胞迁移能力的影响,敲低 METTL14、YTHDF1 后,采用 Transwell 细胞迁移实验检测 SiHa 细胞的迁移能力。结果显示,相对于 si-NC 组,si-METTL14

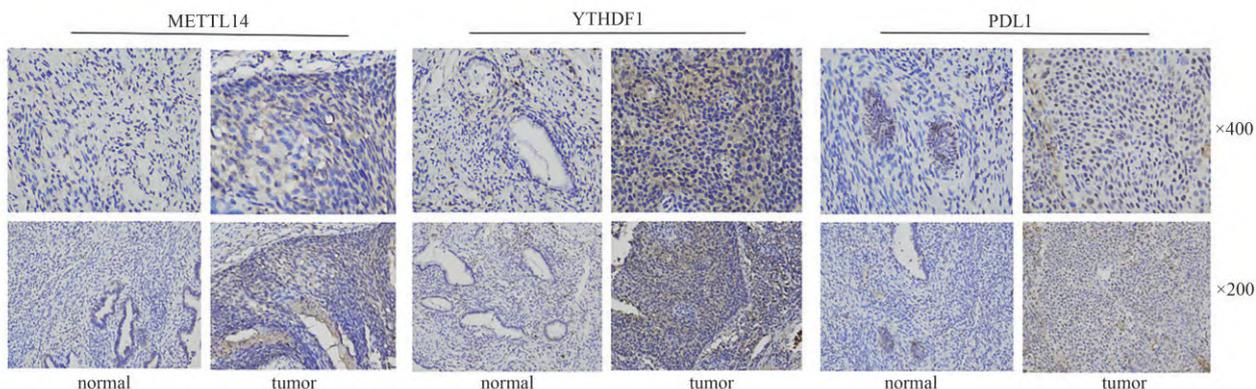
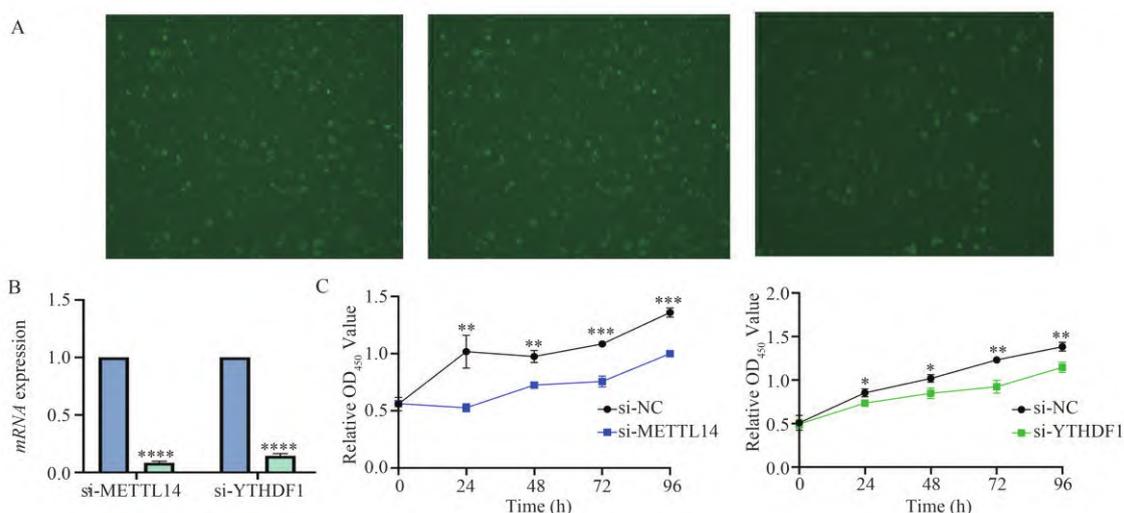


图1 免疫组化染色检测METTL14、YTHDF1、PD-L1在宫颈癌组织中的表达水平

Fig 1 Immunohistochemical staining for the expression levels of METTL14, YTHDF1, and PD-L1 in cervical cancer tissue



A: 荧光显微镜粗略观察敲低效果; B: 实时荧光定量PCR验证敲低效率; C: CCK-8法检测SiHa细胞活性。

图2 敲低METTL14、YTHDF1对SiHa细胞活性的影响

Fig 2 The effect of knocking down METTL14 and YTHDF1 on the activity of SiHa cells

组和 si-YTHDF1 组的细胞迁移数量明显减少, ($P < 0.05$, 图3), 表明敲低 METTL14、YTHDF1 可以显著抑制宫颈癌 SiHa 细胞的迁移能力。

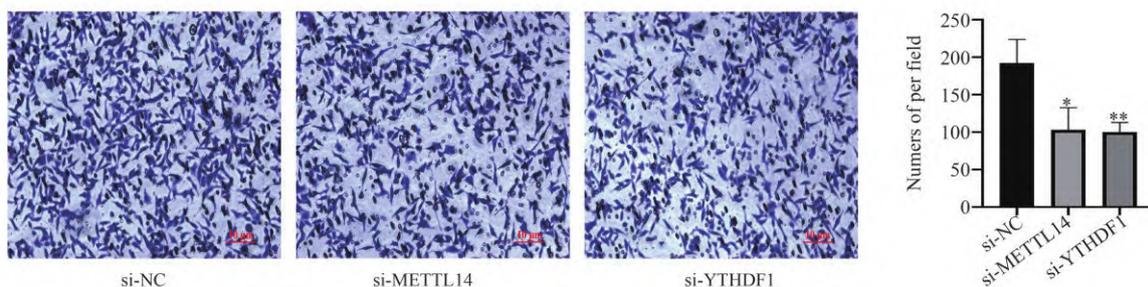


图3 敲低METTL14、YTHDF1对SiHa细胞迁移能力的影响

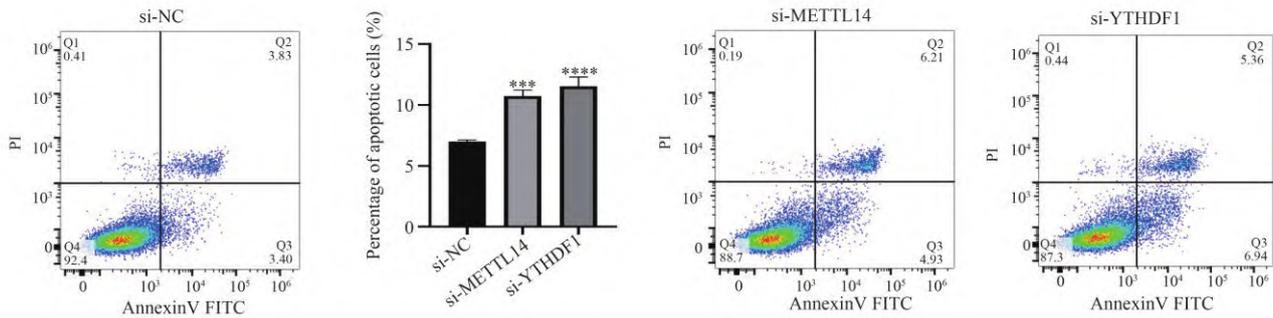
Fig 3 The effect of knocking down METTL14 and YTHDF1 on SiHa cell migration

2.4 敲低 METTL14、YTHDF1 促进 SiHa 细胞的凋亡

为了明确 METTL14、YTHDF1 是否影响 Si-

Ha 细胞的凋亡, 在敲低 METTL14、YTHDF1 后, 利用流式细胞仪检测 SiHa 细胞凋亡情况。结果显示, 敲低 METTL14、YTHDF1 后, SiHa 细胞凋亡

数量明显增多($P < 0.05$, 见图 4)。



左下象限为正常细胞,左上象限为机械性损伤的正常细胞,右下象限为早期凋亡细胞,右上象限为晚期凋亡细胞。

图 4 敲低 METTL14、YTHDF1 后对 SiHa 细胞凋亡的影响

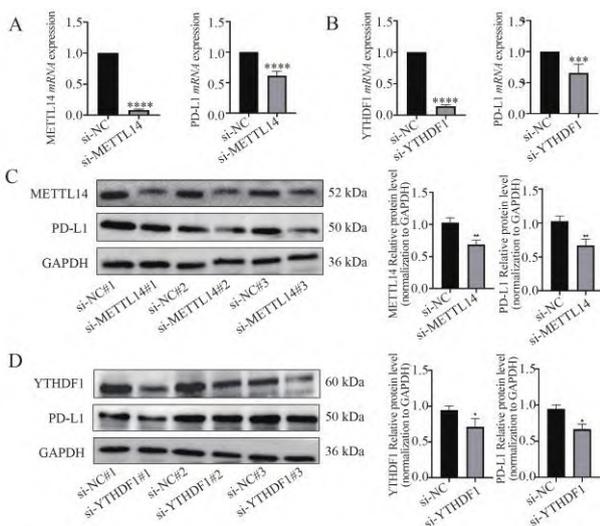
Fig 4 The effect of knocking down METTL14 and YTHDF1 on SiHa cell apoptosis

2.5 敲低 METTL14、YTHDF1 抑制 PD-L1 的表达

通过 qPCR 法检测敲低 METTL14 和 YTHDF1 后对 PD-L1 mRNA 表达的影响,结果显示,敲低 METTL14、YTHDF1 表达后,PD-L1 mRNA 的表达明显下调($P < 0.05$,图 5A、B)。进一步通过 Western blot 检测敲低 METTL14 和 YTHDF1 表达后是否影响 PD-L1 蛋白的表达,结果显示,PD-L1 蛋白的表达也随着 METTL14 和 YTHDF1 的敲低而明显下调($P < 0.05$,图 5C、D)。

3 讨论

宫颈癌的传统治疗主要采用手术、放化疗。近几年,一些新的靶向药物也被用于宫颈癌的治疗,如靶向血管内皮生长因子和表皮生长因子受体等,这些药物可以更加精准地攻击宫颈癌细胞,减少对正常细胞的伤害^[8]。同时,利用人工智能、基因编辑、核酸递送等新技术开发的新型治疗方法也在被广泛研究^[9]。此外,随着首个 PD-1 抑制剂派姆单抗(pembrolizumab)及极具价格优势的国产 PD-1 抑制剂的获批上市,免疫治疗也逐渐成为宫颈癌治疗的研究热点^[10]。研究人员还通过对宫颈癌患者的组织和血液样本进行分析,发现表观遗传修饰、基因突变等因素在宫颈癌的发生和发展中也发挥着重要作用,并识别了一系列潜在的生物标志物,为宫颈癌的治疗提供了新的靶点和方法^[11]。本研究通过免疫组织化学染色法观察 m⁶A 修饰相关调节基因 METTL14、YTHDF1 和免疫检查点 PD-L1 在宫颈癌组织和正常宫颈组织中的表达情况,也发现 METTL14、YTHDF1 和 PD-L1 在宫颈癌组织中显著高表达,推测 m⁶A 相关基因与免疫检查点之间具有一定的相关性,严重影响着宫颈癌的进展和预后。



A: 敲低 METTL14 后 PD-L1 mRNA 的表达水平; B: 敲低 YTHDF1 后 PD-L1 mRNA 的表达水平; C: 敲低 METTL14 后 PD-L1 蛋白的表达水平; D: 敲低 YTHDF1 后 PD-L1 蛋白的表达水平。

图 5 敲低 METTL14、YTHDF1 对 PD-L1 表达的影响

Fig 5 The effect of knocking down METTL14 and YTHDF1 on PD-L1 expression

m⁶A 甲基化修饰可调控疾病的进展过程,在不同肿瘤中有着不同的调控作用,近年来受到肿瘤治疗界的广泛关注^[12]。甲基转移酶样蛋白 14(Methyltransferase-Like Protein 14, METTL14)是催化 m⁶A 修饰的主要甲基化酶之一,在催化 m⁶A 在 RNA 上的甲基化,包括稳定性、剪接、运输和翻译等方面发挥着重要作用^[13]。研究发现 METTL14 通过促进 YTHDF2 以 m⁶A 修饰依赖的方式降解诱导泛素连接酶(Siah2)在胆管癌中表达,而 Siah2 的表达可

抑制PD-L1的表达。同时,研究还发现Siah2低表达的肿瘤对PD-1抑制剂治疗更为敏感,进而证实了METTL14-Siah2-PD-L1调节轴在癌症免疫治疗中的潜在作用^[14]。此外,研究还发现沉默METTL14的同时联合PD-1抑制剂治疗可有效抑制肿瘤进展,增强免疫治疗效果,其主要作用机制为抑制METTL14可改变肿瘤微环境中CD8⁺TIL的招募,使癌症患者对免疫治疗敏感^[15]。YTH结构域家族蛋白1(YTH N6-Methyladenosine RNA Binding Protein 1, YTHDF1)是一种与m⁶A修饰相关的RNA结合蛋白,通过与mRNA上的m⁶A结合调控mRNA的翻译^[16]。有研究证实,YTHDF1缺陷小鼠相较于野生型小鼠,肿瘤细胞内特异性抗原的提呈及CD8⁺T细胞的激活更强,从而表现出更持久的抗肿瘤反应。因此,研究通过下调YTHDF1并联合PD-1抑制剂,发现YTHDF1以m⁶A依赖的方式调节树突状细胞中溶酶体蛋白酶的表达,进而增强了免疫检查点抑制剂的治疗效果^[17]。AlkB同源物5(AlkB homolog5, ALKBH5)作为一种重要的m⁶A去甲基化酶,对m⁶A甲基化组的测序发现,PD-L1 mRNA是m⁶A修饰的直接靶点,肿瘤固有的ALKBH5可通过维持肿瘤细胞PD-L1的表达来抑制T细胞的扩增,进而促进肿瘤进展^[18]。这些结果均证实了靶向m⁶A的免疫调控治疗方案的可行性,是克服肿瘤免疫耐药的新思路。虽然靶向肿瘤免疫联合治疗在癌症治疗中已取得进展,但在宫颈癌研究中仍处于发展阶段。因此,有必要深入探索宫颈癌免疫治疗获益的潜在作用靶点和有效联合方式。本研究首先通过在宫颈癌组织中发现m⁶A修饰相关调节基因METTL14、YTHDF1和免疫检查点PD-L1均显著高表达,且表达水平呈现正相关。之后在SiHa细胞中敲低METTL14和YTHDF1基因的表达,通过CCK-8实验、Transwell实验、细胞流式实验验证METTL14、YTHDF1对宫颈癌细胞功能的影响,发现敲低METTL14和YTHDF1可显著抑制SiHa细胞的增殖和迁移,促进SiHa细胞的凋亡。同时通过qPCR和Western blot法验证METTL14、YTHDF1与PD-L1的相关性,发现PD-L1的表达水平随着METTL14和YTHDF1下调而降低。因此,本研究得出m⁶A相关调节因子METTL14和YTHDF1显著影响宫颈癌细胞的功能,并通过促进PD-L1的表达来促进宫颈癌的发生发展及免疫耐药,其作用机制还需要进一步深入研究。本研究也推测METTL14和YTHDF1可能是靶向肿瘤免疫联合治疗的有效靶点,也可能是筛选宫颈癌免疫治

疗潜在获益人群的生物标志物。未来可通过针对METTL14或YTHDF1靶点的小分子抑制剂联合PD-L1抑制剂进行宫颈癌治疗,或通过检测METTL14或YTHDF1联合PD-L1的表达来筛选免疫治疗受益人群。

作者贡献度说明:

余敏敏:负责实验设计、实验指导及论文修改;杨京蕊:负责实验实施、数据处理及论文撰写;夏娜娜:负责部分实验实施和数据处理。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- 周晖,刘昀昀,罗铭,等.《2022 NCCN子宫颈癌临床实践指南(第1版)》解读[J]. *中国实用妇科与产科杂志*. 2021;37(12):1220-1226.
- Monk BJ, Enomoto T, Kast WM, et al. Integration of immunotherapy into treatment of cervical cancer: Recent data and ongoing trials[J]. *Cancer Treat Rev*, 2022, 106(5):102385.
- Lu M, Zhang Z, Xue M, et al. N(6)-methyladenosine modification enables viral RNA to escape recognition by RNA sensor RIG-I [J]. *Nature Microbiol*, 2020, 5(4):584-598.
- Liu Z, Wang T, She Y, et al. N6-methyladenosine-modified circIGF2BP3 inhibits CD8⁺T-cell responses to facilitate tumor immune evasion by promoting the deubiquitination of PD-L1 in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1):105.
- Wan W, Ao X, Chen Q, et al. METTL3/IGF2BP3 axis inhibits tumor immune surveillance by upregulating N6-methyladenosine modification of PD-L1 mRNA in breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1):60.
- Zhang W, Xiao P, Tang J, et al. M6A regulator-mediated tumour infiltration and methylation modification in cervical cancer microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2022, 13(4):888650.
- Marquina G, Manzano A, Casado A. Targeted agents in cervical cancer: Beyond bevacizumab [J]. *Curr Oncol Rep*, 2018, 20(5):40.
- Raguram A, Banskota S, Liu DR. Therapeutic *in vivo* delivery of gene editing agents [J]. *Cell*, 2022, 185(15):2806-2827.
- Yang J, Hu L. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to

- small molecules [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39 (1) : 265-301.
- 11 Pan J, Xu L, Pan H. Development and validation of an m6A RNA methylation regulator-based signature for prognostic prediction in cervical squamous cell carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2020, 10(8): 1444.
- 12 Jiang X, Liu B, Nie Z, et al. The role of m6A modification in the biological functions and diseases [J]. *Signal Transduct Targeted Ther*, 2021, 6(1): 74.
- 13 Shi B, Liu WW, Yang K, et al. The role, mechanism, and application of RNA methyltransferase METTL14 in gastrointestinal cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21 (1):163.
- 14 Zheng H, Zheng WJ, Wang ZG, et al. Decreased expression of programmed death ligand-L1 by seven in absentia homolog 2 in cholangiocarcinoma enhances T-cell-mediated antitumor activity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13(1): 845193.
- 15 Wang L, Hui H, Agrawal K, et al. M(6) A RNA methyltransferases METTL3/14 regulate immune responses to anti-PD-1 therapy [J]. *EMBO J*, 2020, 39 (20) : e104514.
- 16 Liu T, Wei Q, Jin J, et al. The m6A reader YTHDF1 promotes ovarian cancer progression *via* augmenting EIF3C translation [J]. *Nucl Acids Res*, 2020, 48(7) : 3816-3831.
- 17 Han D, Liu J, Chen C, et al. Anti-tumour immunity controlled through mRNA m (6) A methylation and YTHDF1 in dendritic cells [J]. *Nature*, 2019, 566 (7743): 270-274.
- 18 Qiu X, Yang S, Wang S, et al. M(6) A demethylase ALKBH5 regulates PD-L1 expression and tumor immunoenvironment in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(18): 4778-4793.

[本文编辑] 邹洲 宋睿璞 朱昊

(上接第 1464 页)

- 19 Vandeput F, Backers K, Villeret V, et al. The influence of anionic lipids on SHIP2 phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase activity [J]. *Cell Signal*, 2006, 18(12): 2193-2199.
- 20 Ye Y, Ge YM, Xiao MM, et al. Suppression of SHIP2 contributes to tumorigenesis and proliferation of gastric cancer cells *via* activation of Akt [J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(3): 230-240.
- 21 Ghosh S, Huber C, Siour Q, et al. Fibroblasts derived from patients with opsismodysplasia display SHIP2-specific cell migration and adhesion defects [J]. *Human Mutat*, 2017, 38(12): 1731-1739.
- 22 Hoekstra E, Das AM, Willemsen M, et al. Lipid phosphatase SHIP2 functions as oncogene in colorectal cancer by regulating PKB activation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (45): 73525-73540.
- 23 Fu CH, Lin RJ, Yu J, et al. A novel oncogenic role of inositol phosphatase SHIP2 in ER-negative breast cancer stem cells: Involvement of JNK/vimentin activation [J]. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2014, 32(8): 2048-2060.
- 24 Zhou X, Liu Y, Tan G. Prognostic value of elevated SHIP2 expression in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(7): 589-595.
- 25 Tang T, Xiao ZY, Shan G, et al. Descending-SHIP2-mediated radiosensitivity enhancement through PI3K/Akt signaling pathway in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Biomed Pharm*, 2019, 118 (10):109392.
- 26 Azzi A. SHIP2 inhibition alters redox-induced PI3K/AKT and MAP kinase pathways *via* PTEN over-activation in cervical cancer cells [J]. *FEBS open bio*, 2020, 10(10): 2191-2205.

[本文编辑] 邹洲 宋睿璞 朱昊