

· 论 著 ·

宫颈癌微环境TOX信号通路诱导T细胞耗竭介导的免疫逃逸机制

刘 丹, 张谷香, 谢 丹, 徐 艳, 谢诚芳, 唐雨曦

长沙市第四医院(长沙市中西医结合医院, 湖南师范大学附属长沙医院)妇产科, 湖南长沙410203

[摘要] 背景与目的: 免疫检查点阻断 (immune checkpoint blockade, ICB) 已成为宫颈癌 (cervical cancer, CC) 治疗领域有前景的新治疗策略, 但终末T细胞耗竭仍然会限制ICB的疗效。分选连接蛋白-9 (sorting nexin-9, SNX9) 的缺失能够抑制胸腺细胞选择相关高迁移率族盒蛋白 (thymocyte selection-associated high mobility group box protein, TOX) 缓解T细胞的耗竭, 为预防T细胞耗竭和增强癌症免疫治疗效果提供了新思路。因此, 本研究旨在探讨CC微环境中的SNX9/TOX信号通路诱导CD8⁺ T细胞耗竭介导的免疫逃逸机制。方法: 共收集54份外周血样品, 其中18份来自CC患者, 18份来自高级别鳞状上皮内病变 (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) 患者, 18份来自宫颈正常的受试者。此外, 研究收集了在本院进行初次手术的153对CC及癌旁组织。从医院记录中获得CC患者的临床病理学特征、肿瘤分期、随访记录和其他相关临床病理学数据。本研究经长沙市第四医院伦理委员会批准 (审批号: 20220206)。24只小鼠随机分配到免疫球蛋白G (immunoglobulin G, IgG) 组、Anti-SNX9组、Anti-程序性死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1) 组和Anti-SNX9+Anti-PD-1组, 每组6只。各组分别接受腹腔内注射封闭抗体和同型对照治疗。通过ELISpot检测CD8⁺ T细胞分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 的能力。采用蛋白质印迹法 (Western blot)、免疫组织化学检测CC组织中TOX和SNX9的表达。结果: CC患者的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中SNX9、TOX mRNA的表达明显高于HSIL和正常对照 ($P < 0.05$)。CC组织中SNX9的阳性细胞水平、TOX免疫组织化学评分较癌旁组织显著提高 ($t = 18.63$ 、 21.10 , $P < 0.001$)。SNX9在CC中的高表达与低分化/未分化、肿瘤大小、宫旁浸润、阴道浸润、晚期FIGO分期及盆腔淋巴结转移相关 ($P < 0.05$)。与SNX9低表达组相比, SNX9高表达组CC患者手术后的总生存期较短 ($P < 0.05$)。CC患者的CD8⁺SNX9⁺ T细胞的比例明显高于正常对照和HSIL患者 ($P < 0.05$)。CD8⁺SNX9⁺ T细胞分泌细胞因子 (TNF- α 和IFN- γ) 的能力显著低于CD8⁺SNX9⁻ T细胞 ($P < 0.05$)。与Anti-SNX9组相比, Anti-SNX9+Anti-PD-1组子宫颈肿瘤的生长和增殖、肿瘤组织中的SNX9、TOX蛋白表达进一步降低 ($P < 0.05$), 肿瘤组织中浸润性CD8⁺ T淋巴细胞的水平和CD8⁺ T淋巴细胞分泌功能因子TNF- α 和IFN- γ 的能力进一步提高 ($P < 0.05$)。结论: SNX9/TOX信号在CC患者和小鼠模型中表现出增强的活性, 并且与免疫抑制有关。针对SNX9/TOX信号通路可能是CC的潜在治疗策略。

[关键词] 宫颈癌; 分选连接蛋白-9; 胸腺细胞选择相关高迁移率族盒蛋白; 免疫逃逸; T细胞耗竭

中图分类号: R737.33 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2025.07.007

基金项目: 湖南省卫生健康委科研课题计划项目 (D20230217951)。

利益冲突: 无。

伦理批件: 20220206。

知情同意: 有。

引用本文: 刘 丹, 张谷香, 谢 丹, 等. 宫颈癌微环境TOX信号通路诱导T细胞耗竭介导的免疫逃逸机制 [J]. 中国癌症杂志, 2025, 35(7): 685-694.

Funding: Hunan Provincial Health Commission Scientific Research Project (D20230217951).

Conflicts of interest: no.

Ethical approval: 20220206.

Informed consent: available.

Cite this article: LIU D, ZHANG G X, XIE D, et al. Mechanism of immune escape mediated by T cell depletion induced by TOX signaling pathway in cervical cancer microenvironment [J]. China Oncol, 2025, 35(7): 685-694.

of Obstetrics and Gynecology, The Fourth Hospital of Changsha (Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital of Changsha, Changsha Hospital of Hunan Normal University), Changsha 410203, Hunan Province, China]

Correspondence to: ZHANG Guxiang E-mail: ttshlx0@163.com

[**Abstract**] **Background and purpose:** Immune checkpoint blockade (ICB) has become a promising strategy for treating cervical cancer (CC), but terminal T cell depletion still limits the therapeutic efficacy of ICB. The deletion of sorting nexin-9 (SNX9) can inhibit thymocyte selection-associated high mobility group box protein (TOX), alleviate T cell exhaustion, and provide new ideas for preventing T cell exhaustion and enhancing the efficacy of cancer immunotherapy. Therefore, this study aimed to explore the immune escape mechanism mediated by the depletion of CD8⁺ T cells induced by the SNX9/TOX signaling pathway in the CC microenvironment. **Methods:** Fifty-four peripheral blood samples were collected, including 18 from CC patients, 18 from patients with high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) and 18 from subjects with normal cervix. In addition, the study collected 153 pairs of CC and adjacent tissues from patients who received operation in our hospital for the first time. Clinicopathological features, tumor stages, follow-up records and other relevant clinicopathological data of CC patients were obtained from hospital records. The research was approved by the ethics committee of Changsha Fourth Hospital (approval number: 20220206). A total of 24 mice were randomly assigned to the following four groups: immunoglobulin G (IgG) group, Anti-SNX9 group, Anti-programmed death-1 (PD-1) group and Anti-SNX9⁺Anti-PD-1 group, with 6 mice in each group. Each group received intraperitoneal injection of blocking antibody and isotype control treatment respectively. ELISpot was used to detect the ability of CD8⁺ T cells to secrete tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ). The expressions of TOX and SNX9 in cervical cancer tissues were detected by western blot and immunohistochemistry. **Results:** The expressions of SNX9 and TOX mRNA in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of CC patients were higher compared with HSIL and normal controls ($P < 0.05$). The positive cell level of SNX9 and TOX immunohistochemical score were higher in CC tissue than in adjacent tissues ($t = 18.63, 21.10, P < 0.001$). The high expression of SNX9 in CC was related to low differentiation/undifferentiation, tumor size, parauterine infiltration, vaginal infiltration, late FIGO stage and pelvic lymph node metastasis ($P < 0.05$). Compared with the low expression group of SNX9, the overall survival time of CC patients in the high expression group of SNX9 was shorter ($P < 0.05$). The percentage of CD8⁺SNX9⁺ T cells was significantly higher in CC patients than in normal controls and HSIL patients ($P < 0.05$). The ability of CD8⁺SNX9⁺ T cells to secrete cytokines (TNF- α and IFN- γ) was significantly lower compared with CD8⁺SNX9⁻ T cells ($P < 0.05$). Compared with the Anti-SNX9 group, the growth and proliferation of cervical tumor, the expression of SNX9 and TOX protein in tumor tissue in the Anti-SNX9+Anti-PD-1 group further decreased ($P < 0.05$), and the level of infiltrating CD8⁺ T lymphocytes in tumor tissue and the ability of CD8⁺ T lymphocytes to secrete functional factors TNF- α and IFN- γ further increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** SNX9/TOX signaling pathway exhibits enhanced activity in patients with cervical cancer and mouse models, and is related to immunosuppression. Targeting SNX9/TOX signaling pathway may be a potential therapeutic strategy for CC.

[**Key words**] Cervical cancer; Sorting connexin-9; Thymocyte selection-associated high mobility group box protein; Immune escape; T cell depletion

宫颈癌 (cervical cancer, CC) 是全球女性中常见的恶性肿瘤, 也是女性癌症相关死亡的主要原因^[1]。2020年GLOBOCAN数据^[2]显示, 全球CC新发病例约60.4万例, 死亡病例约34.2万例。CC的一个主要病理生理学特征是免疫系统功能障碍, 主要表现为体液和细胞免疫缺陷状态以及自身免疫性疾病、感染和继发性恶性肿瘤的高发病率^[3]。近年来, 免疫检查点阻断 (immune checkpoint blockade, ICB) 通路的免疫调节药物的开发已成为治疗包括CC在内的多种恶性肿瘤的有前景策略^[4]。抗程序性死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1) 及其配体 (PD-L1) 单克隆抗体的治疗虽然可以重振一些T细胞, 但终末T细胞耗竭仍然限制了ICB的治疗效果; 帕博利珠单抗和纳武利尤单抗在治疗CC

期间, 获得完全缓解或部分缓解的患者分别只有14.0%和26.3%^[5-6]。因此, 急需找到针对其他免疫检查点的免疫调节剂来治疗CC。最近, 有学者基于人类肿瘤细胞开发出一种类似于在患者机体肿瘤中发现的耗竭淋巴细胞, 并利用CRISPR/Cas9技术发现分选连接蛋白-9 (sorting nexin-9, SNX9) 的缺失可以抑制胸腺细胞选择相关高迁移率族盒蛋白 (thymocyte selection-associated high mobility group box protein, TOX) (一种与末期衰竭相关的转录因子) 缓解T细胞的耗竭, 为预防T细胞耗竭和增强癌症免疫治疗效果提供了新思路^[7]。然而, SNX9在CC微环境肿瘤免疫逃逸中的潜在作用尚未见报道, 其调控机制尚不清楚。因此, 本研究旨在揭示SNX9/TOX信号通路诱导T细胞耗竭介导的免疫逃逸机制。

1 材料和方法

1.1 患者和组织样本

收集了54份外周血样品，其中18份来自CC患者，18份来自高级别鳞状上皮内病变（high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL）患者，18份来自宫颈正常的受试者。此外，研究收集了在长沙市第四医院进行初次手术的153对CC及癌旁组织。从医院记录中获得CC患者的临床病理学特征、手术日期、肿瘤分期、随访记录和其他相关临床病理学数据。本研究经长沙市第四医院伦理委员会批准（审批号：20220206），并且所有患者均签署了知情同意书。

基因表达谱交互式分析平台（gene expression profiling interactive analysis, GEPIA）是一个生物信息学平台，可在线分析33种人类肿瘤中的肿瘤和正常组织的差异表达，包括宫颈癌（cervical squamous cell carcinoma, CESC）。本研究通过GEPIA在线数据库分析SNX9在CC组织中的表达与总生存期的关联，对来自TCGA和GTEx数据库中的146例SNX9基因高表达CESC样本和146例SNX9基因低表达CESC样本的CC组织进行对比分析。

1.2 细胞分离、培养

小鼠CC细胞系U14购自美国模式培养物保藏中心。U14细胞接种在含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基（美国Gibco公司）中。采用Ficoll密度梯度离心法从全血中分离外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC）。使用组织解离管C管（德国Milteny Biotec公司）对小鼠肿瘤组织进行组织分离，使用肿瘤解离试剂盒（德国Milteny Biotec公司）进行酶水解。将消化的细胞通过70 μm网过滤，经Ficoll密度梯度离心法，获得单核细胞重悬于RPMI-1640培养基中。使用CD8⁺ T细胞试剂盒（德国Milteny Biotec公司）从PBMC、单核细胞中纯化CD8⁺ T细胞。

在T细胞扩增培养基（加拿大Stemcell公司）中用抗CD3/CD28抗体（加拿大Stemcell公司）刺激CD8⁺ T细胞。活化的CD8⁺ T细胞用5或10 μg/mL TOX-Fc（美国R&D Systems公司）处理。活化的CD8⁺ T细胞与U14细胞以10:1的比例共培养，向细胞中加入10 μg/mL抗PD-1单克隆抗体（Anti-PD-1）或5 μg/mL抗SNX9单克隆抗体（Anti-SNX9）（美国R&D Systems公司）。使用人免疫球蛋白G（immunoglobulin G, IgG）

（美国R&D Systems公司）作为同型对照。48 h后，收集CD8⁺ T细胞，采用酶联免疫斑点技术（enzyme-linked immunospot assay, ELISpot）检测细胞因子的产生。

1.3 ELISpot检测

使用γ干扰素（interferon-γ, IFN-γ）免疫斑点试剂盒和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α, TNF-α）免疫斑点试剂盒（美国CTL公司）进行ELISpot分析。采用试剂盒缓冲液以1:10稀释100 μL CD8⁺ T细胞悬液，并将50 μL稀释的样品加入每个孔中。使用CTL S6 Entry（美国CTL公司）对样本进行定量，结果以斑点数量和平均斑点大小的乘积（μm²）表示，并根据表达TNF-α和IFN-γ的细胞数量计算所占CD8⁺ T细胞总数的百分比。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR）

使用TRIzol试剂（美国Invitrogen公司）从PBMC中提取总RNA。用分光光度法定量总RNA后，用PrimeScript RT试剂盒（湖南艾科瑞生物工程有限公司）进行反转录。使用SYBR Premix Ex Taq（湖南艾科瑞生物工程有限公司）在CFX96 Touch RTFQ-PCR检测系统（美国Bio-Rad公司）上检测基因的相对表达。反应条件如下：95 °C预变性10 min，94 °C变性15 s，60 °C退火30 s，40个循环。使用标准的2^{-ΔΔCt}方法计算相对mRNA表达，以β-actin作为内标。本研究使用的引物序列如下：SNX9的正向引物序列为5'-GACTTGGGGTGGCACATCTC-3'，反向引物序列为5'-CGTCCCATCAGGGTAGGTGT-3'；PD-1的正向引物序列为5'-AGGATGGTTCTTAGACTCCCCA-3'，反向引物序列为5'-CACGAAGCTCTCCGATGTGT-3'；LAG3的正向引物序列为5'-AACCTCACTGTTCTGGGTCTG-3'，反向引物序列为5'-AGTCGCCATTGTCTCCAGTC-3'；Tim3的正向引物序列为5'-TCATCAAACCAGCCAAAGGTCA-3'，反向引物序列为5'-GTCCCCTGGTGGTAAGCATC-3'；β-actin的正向引物序列为5'-TTCCAGCCTTCCTTCTTG-3'，反向引物序列为5'-GGAGCCAGAGCAGTAATC-3'。

1.5 流式细胞术

将分离自CC患者或正常人的PBMC用藻红蛋白（phycoerythrin, PE）缀合的抗CD8（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司）和PE缀合的抗

SNX9 FITC (美国eBioscience公司) 抗体在4 °C下染色30 min。收集样品并使用FACS Calibur流式细胞仪 (美国Becton Dickinson公司) 分析染色的细胞, 并使用FlowJo软件分析数据。

1.6 蛋白质印迹法 (Western blot) 分析

将肿瘤组织或细胞溶解在含有蛋白酶抑制剂苯基甲烷磺酰氟的放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司) 中。用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒 (美国Thermo Fisher Scientific公司) 测量蛋白浓度。将5倍样品缓冲液与蛋白质样品 (1 : 4) 混合, 通过10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离。转移到聚偏二氟乙烯膜 (美国Millipore公司) 后, 室温下用5%脱脂牛奶封闭膜1 h, 然后与针对SNX9 (1 : 1 000, 美国Cell Signaling Technology公司)、TOX (1 : 1 000, 美国Cell Signaling Technology公司)、磷酸化I κ B α (phospho-I κ B α , p-I κ B α) (1 : 1 500, 英国Abcam公司)、磷酸化P65蛋白 (phospho-p65, p-P65) (1 : 1 000, 美国Cell Signaling Technology公司)、 β -actin (1 : 10 000, 美国Cell Signaling Technology公司) 一抗于4 °C温育过夜。在室温下与过氧化物酶偶联的二抗 (1 : 5 000, 英国Abcam公司) 温育1 h后, 通过增强化学发光系统 (美国Thermo Fisher公司) 观察条带。

1.7 体内治疗

24只雌性C57BL/6小鼠 (18~22 g, 4~6周龄) 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。所有小鼠饲养在湿度为50%~60%、温度为24~26 °C且光照/黑暗周期为12 h的受控环境中。将U14细胞用胰蛋白酶消化, 重悬于磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 中, 并将200 μ L (1×10^7 个细胞) 的细胞悬浮液皮下注射入每只小鼠的右腋窝。对于体内阻断, 在注射细胞悬浮液3 d后, 将24只小鼠随机分配到IgG组、Anti-SNX9组、Anti-PD-1组和Anti-SNX9+Anti-PD-1组, 每组6只。各组分别接受腹腔内注射Anti-PD-1 mAb (100 μ g, 美国BioXcell公司)、Anti-SNX9 mAb (100 μ g, 美国BioXcell公司)、Anti-SNX9 mAb+Anti-PD-1 mAb和IgG (小鼠IgG1, 美国BioXcell公司) 治疗, 每周进行3次, 连续治疗4次, 并在注射细胞悬液15 d后处死小鼠, 收集肿瘤组织用于后续分析。

1.8 免疫组织化学

肿瘤切片脱蜡, 然后加入柠檬酸缓冲液进行抗原修复。使用免疫组织化学检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司) 进行免疫组织化学分析。将切片与初级抗体 (抗人SNX9, 1 : 100, 美国Cell Signaling Technology公司; 抗人TOX, 1 : 100, 美国Cell Signaling Technology公司; 抗人CD8, 1 : 100, 英国Abcam公司; 抗鼠CD8, 1 : 200, 美国Cell Signaling Technology公司) 在4 °C下温育过夜。然后将切片与生物素标记的山羊抗兔IgG二抗在37 °C下温育10 min, 并将链霉亲和素结合的过氧化物酶与切片在37 °C下温育15 min。将切片用Mayer苏木精 (北京索莱宝科技有限公司) 染色5 min, 脱水后用中性树脂密封。根据阳性染色肿瘤细胞的百分比, 染色强度从0到3, 其异质性从0到5。根据染色强度和阳性细胞频率计算免疫组织化学评分 (0~15)。

1.9 统计学处理

使用GraphPad Prism 9.5软件对数据进行统计学分析。计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 示。两组之间的差异比较采用 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析, 采用事后Dunnett检验进行两两比较。使用 χ^2 检验分析分类数据。通过Kaplan-Meier方法绘制生存概率曲线, 通过对数秩检验进行组间生存期比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SNX9在CC患者中高表达

通过RTFQ-PCR分析PBMC中SNX9 mRNA表达, 结果显示, CC患者中SNX9的表达明显高于HSIL和正常对照 (8.48 ± 2.58 、 3.78 ± 1.84 和 2.37 ± 1.11 , $F=49.34$, $P < 0.05$, 图1A)。SNX9与CC患者PBMC中CD8⁺ T细胞上的PD-1、LAG3、Tim3表达呈正相关 ($r=0.604$ 、 0.529 、 0.568 , P 均 < 0.05 , 图1B~1D)。CC组织中SNX9的阳性细胞水平较癌旁组织显著增加 ($4\ 425.0 \pm 227.0$ vs 400.5 ± 40.7 , $t=18.63$, $P < 0.001$, 图1E)。为探讨SNX9是否影响CC的临床病理学特征, 根据受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线确定SNX9阳性细胞的最佳临界值为2 105, 将153例CC患者分为SNX9高表达 ($n=99$) 和低表达 ($n=54$) 两组。 χ^2 检验分析表明, SNX9在CC中的高表达与低分化/未分化、肿瘤大小、宫旁浸润、阴道浸润、晚期国际妇产科学联合会 (Federation International of Gynecology and Obstetr, FIGO)

分期和盆腔淋巴结转移相关 ($P < 0.05$, 表1)。本研究还评估了SNX9在预测CC预后中的价值。Kaplan-Meier分析显示, 与SNX9低表达组相比, SNX9高表达组的CC患者手术后的总生存期较短 ($P < 0.05$, 图1F)。GEPIA分析显示, SNX9高表达组的CC患者的总生存期低于SNX9低表达组 ($P < 0.05$, 图1G)。

2.2 CD8⁺SNX9⁺ T细胞在CC患者PBMC中高表达

采用流式细胞术分析CC患者或正常人PBMC

中CD8⁺SNX9⁺ T细胞的比例, 结果显示, CC患者PBMC中CD8⁺SNX9⁺ T细胞的比例明显高于正常对照和HSIL患者 (11.36 ± 5.63 、 3.87 ± 1.74 和 5.59 ± 3.01 , $F = 19.01$, $P < 0.05$, 图2A)。研究进一步比较了PBMC中CD8⁺SNX9⁺ T细胞和CD8⁺SNX9⁻ T细胞的功能, 结果显示, CD8⁺SNX9⁺ T细胞分泌细胞因子 (TNF- α 和IFN- γ) 的能力显著低于CD8⁺SNX9⁻ T细胞 (图2B、2C), 表明CD8⁺SNX9⁺ T细胞具有低效应子功能和抗肿瘤能力。

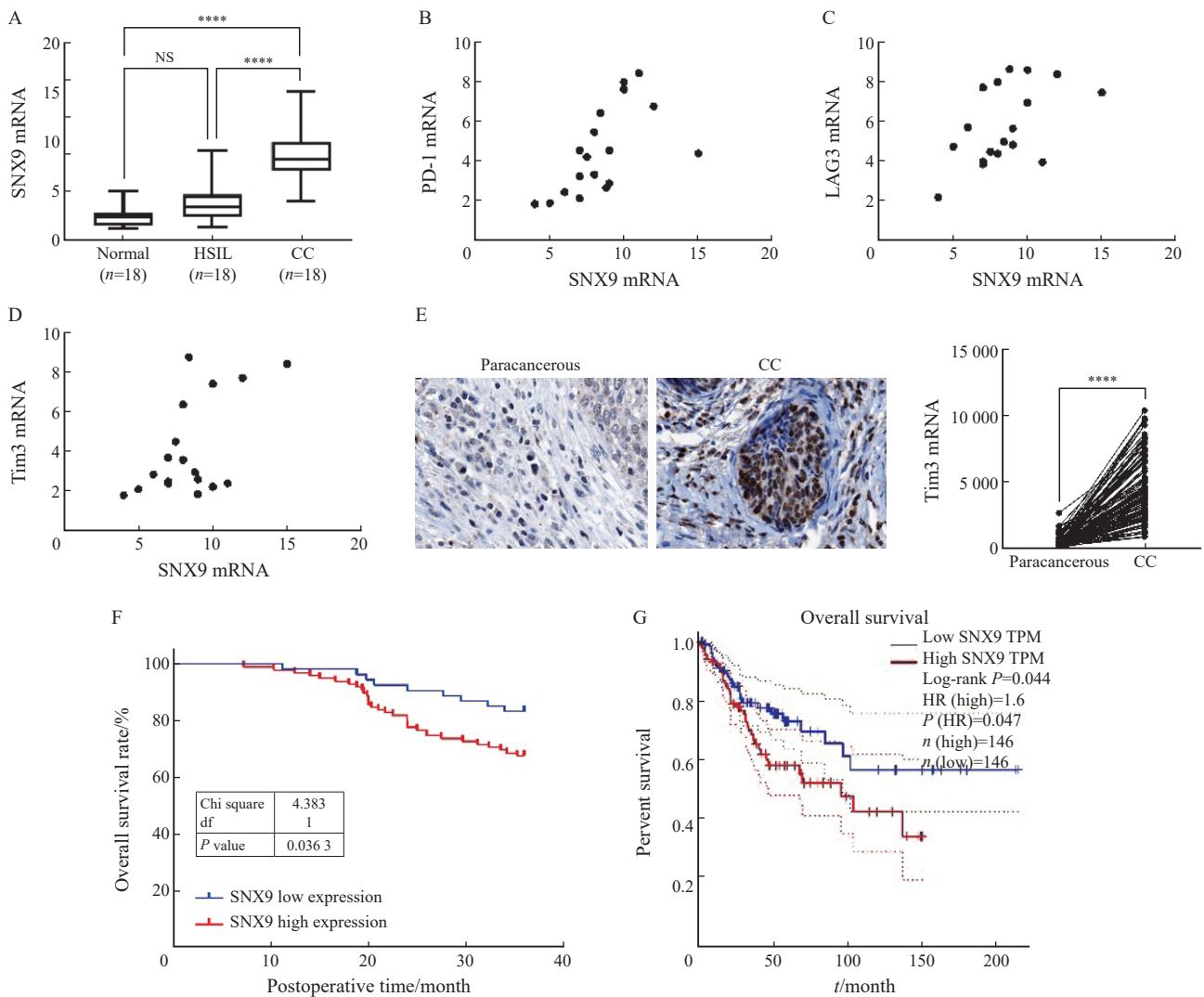


图1 SNX9在CC中表达上调, 并与预后不良相关

Fig. 1 The expression of snx9 is up-regulated in CC, which is related to poor prognosis

A: The level of SNX9 in PBMC of normal cervix ($n = 18$), high squamous intraepithelial lesions ($n = 18$, HSIL) and CC patients ($n = 18$). B-D: Correlation analysis of expressions of SNX9 and PD-1, SNX9 and LAG3, SNX9 and Tim3 in CD8⁺ T cells of PBMC in patients with CC. E: Comparison of SNX9⁺ cells in CC and adjacent tissues (DAB color, magnification 200 times). F: Kaplan-Meier was used to analyze the relationship between the expression of SNX9 in tumor tissues and the overall survival in CC patients ($n = 153$). G: GEPIA online database was used to analyze the relationship between the expression of SNX9 in CC tissues and the overall survival time. NS: No significance; ****: $P < 0.0001$.

2.3 CC组织中SNX9/TOX表达水平上调与CD8⁺ T细胞耗竭相关

通过RTFQ-PCR分析PBMC中TOX mRNA表达, 结果显示, CC患者PBMC中TOX mRNA

表达明显高于HSIL和正常对照 (6.67 ± 2.40 、 3.77 ± 1.03 和 2.68 ± 0.81 , $F = 30.90$, $P < 0.05$, 图3A)。为了解TOX、CD8⁺ T细胞在CC中的临床意义, 通过免疫组织化学检测153对CC组织和癌

表1 SNX9在CC中的表达与临床病理因素的相关性

Tab. 1 Correlation between the expression of SNX9 in CC and clinicopathological factors

Characteristic	SNX9 expression		χ^2	P value
	Low (n=54)	High (n=99)		
Age/year			0.06	0.814
<40	9 (16.7)	18 (18.2)		
>40	45 (83.3)	81 (81.8)		
Differentiation			8.395	0.004
High/moderate	51 (94.4)	75 (75.7)		
Low/Poor	3 (5.6)	24 (24.3)		
FIGO			28.977	<0.001
I	51 (94.4)	51 (51.5)		
II	3 (5.6)	48 (48.5)		
Histology			9.264	0.010
Squamous cell carcinoma	42 (77.7)	87 (87.9)		
Adenocarcinoma	9 (16.7)	3 (3.0)		
Adenosquamous carcinoma	3 (5.6)	9 (9.1)		
Tumor size/cm			4.874	0.027
≤4	45 (83.3)	66 (66.7)		
>4	9 (16.7)	33 (33.3)		
Infiltration of uterine muscle layer			0.618	0.432
No	18 (33.3)	27 (27.3)		
Yes	36 (66.7)	72 (72.7)		
Parauterine infiltration			30.884	<0.001
No	54 (100)	78 (78.8)		
Yes	0 (0.0)	21 (21.2)		
Vaginal infiltration			17.461	<0.001
No	51 (94.4)	63 (63.6)		
Yes	3 (5.6)	36 (36.4)		
Pelvic lymph node metastasis			35.875	<0.001
No	51 (94.4)	45 (45.5)		
Yes	3 (5.6)	54 (54.5)		

旁组织中TOX、CD8⁺ T细胞水平。结果表明, CC组织中TOX免疫组织化学评分(8.36±2.99 vs 2.61±1.62)较癌旁组织显著提高($t=21.10$, $P<0.05$), CD8⁺ T细胞水平(2 207±1 106 vs 2 571±1 419)较癌旁组织显著降低($t=3.04$, $P<0.05$, 图3B、3C)。相关性分析显示, CC组织中TOX免疫组织化学评分和CD8⁺ T细胞水平呈显著负相关性($r=0.496$, $P<0.001$, 图3D), 表明TOX的高表达抑制了CD8⁺ T细胞浸润。此外, 免疫组织化学和GEPHA分析显示, CC组

组织中SNX9和TOX表达呈显著正相关(图3E、3F)。

2.4 SNX9/TOX阻断逆转CC细胞对CD8⁺ T细胞产生细胞因子的抑制作用

与IgG组和低浓度Fc-TOX(5 μg/mL)组相比, 高浓度Fc-TOX(10 μg/mL)处理降低了CD8⁺ T细胞的SNX9、TOX蛋白表达($P<0.05$), 提高了p-IκBα、p-P65蛋白表达和细胞分泌细胞因子IFN-γ、TNF-α的能力($P<0.05$) (图4A~4C)。此外, 与IgG组

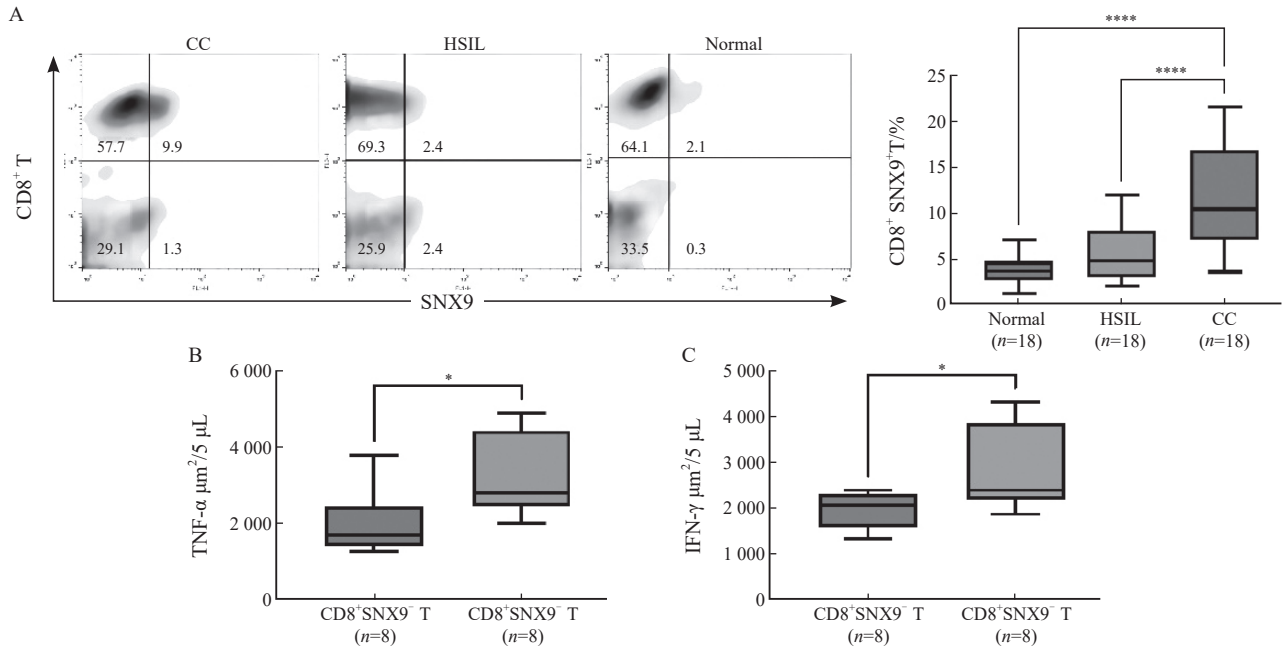


图2 CD8⁺SNX9⁺ T细胞在CC患者PBMC中高表达

Fig. 2 CD8⁺SNX9⁺ T cells were highly expressed in PBMC of CC patients

A: CD8⁺SNX9⁺ T cells in PBMC of normal cervix (n=18), HSIL(n=18) and CC patients (n=18). B-C: CD8⁺ T cells were isolated from PBMC. The levels of TNF-α and IFN-γ secreted by CD8⁺SNX9⁺ T cells and CD8⁺SNX9⁻ T cells were detected by ELISpot. *: P<0.05; ***: P<0.001; ****: P<0.0001.

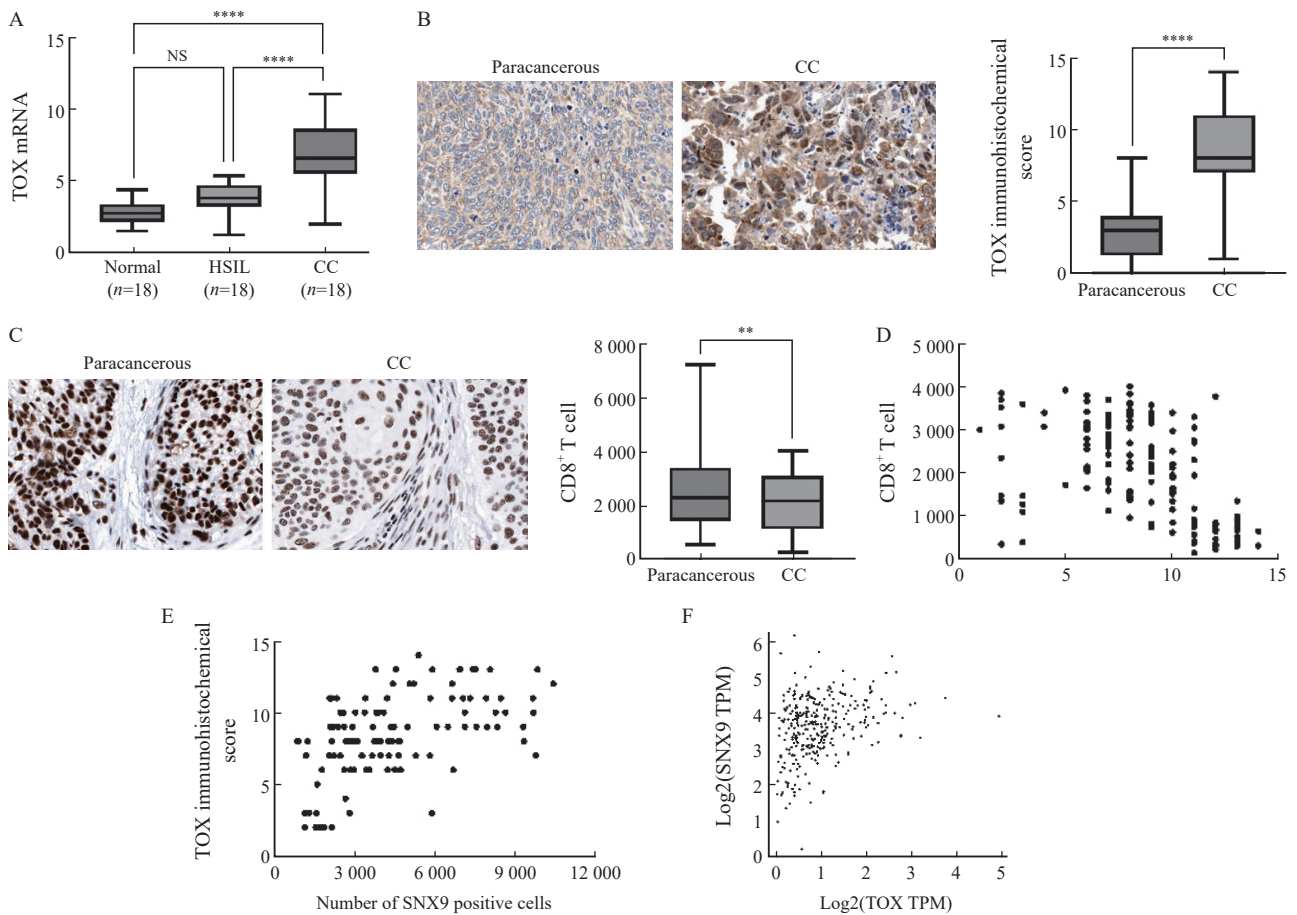


图3 CC组织中SNX9/TOX表达水平上调与CD8⁺ T细胞耗竭相关

Fig. 3 Up-regulation of SNX9/TOX expression in CC tissue is related to CD8⁺ T cell depletion

A: TOX mRNA levels in normal cervix (n=18), HSIL(n=18) and CC patients (n=18) PBMC. B, C: Comparison of TOX immunohistochemical score and CD8⁺ T cell level in CC and adjacent tissues (DAB staining, magnification 200 times). D: Correlation analysis between TOX immunohistochemical score and CD8⁺ T cell level in CC tissues. E: Correlation analysis between TOX immunohistochemical score and SNX9 positive cell level in CC tissues. F: GEPIA online database was used to analyze the correlation between SNX9 and TOX expression in CC tissues. NS: No significance; **: P<0.01; ****: P<0.0001.

相比, 阻断SNX9或PD-1提高了CD8⁺ T细胞中p-IκBα、p-P65蛋白表达和细胞分泌细胞因子IFN-γ、TNF-α的能力 ($P < 0.05$)。同时阻断SNX9和PD-1进一步提高了CD8⁺ T细胞中p-IκBα、p-P65蛋白表达和细胞分泌细胞因子IFN-γ、TNF-α的能力 ($P < 0.05$, 图4D~4F)。

2.5 靶向SNX9以抑制体内肿瘤进展

在实验过程中, IgG组分别在第7、13天死了2只小鼠, 死亡原因为肿瘤负荷过大导致器官功能衰竭。Anti-SNX9治疗组在第11天死了1只小鼠, 死亡原因为肿瘤负荷过大导致器官功能衰竭。Anti-PD-1治疗组在第13天死了1只小鼠, Anti-SNX9+Anti-PD-1治疗组在第13天死了1只小鼠, 死亡原因考虑为癌细胞分泌的炎症因子可能诱发恶病质, 导致小鼠体重骤降。死亡小鼠的数

据不纳入最终分析, 将死亡小鼠密封于生物安全袋并标记实验编号, 存放于-20 °C冰柜中, 统一焚烧处理。

与IgG治疗组相比, Anti-SNX9治疗组子宫颈癌肿瘤的生长和增殖、肿瘤组织中SNX9、TOX蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 肿瘤组织中CD8⁺ T细胞数和CD8⁺ T淋巴细胞分泌功能因子TNF-α和IFN-γ的能力显著增加 ($P < 0.05$), SNX9、TOX蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。与Anti-SNX9治疗组相比, 联合Anti-SNX9和Anti-PD-1治疗组子宫颈癌肿瘤的生长和增殖、肿瘤组织中SNX9、TOX蛋白表达进一步降低 ($P < 0.05$), 肿瘤组织中浸润性CD8⁺ T淋巴细胞的水平和CD8⁺ T淋巴细胞分泌TNF-α和IFN-γ的能力进一步增加 ($P < 0.05$, 图5)。

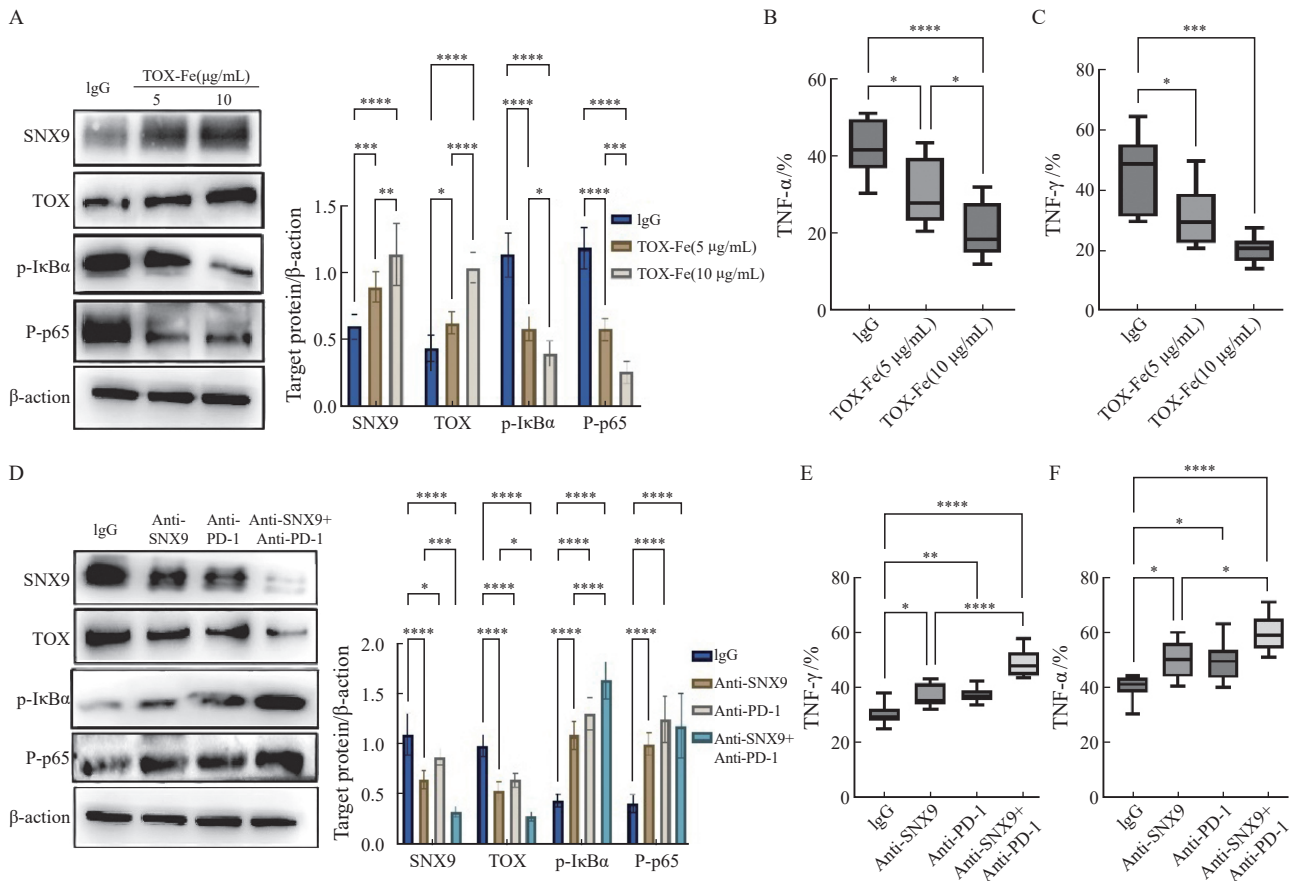


图4 SNX9和PD-1抑制p-IκBα、p-P65蛋白表达和CD8⁺ T细胞产生细胞因子

Fig. 4 SNX9 and PD-1 inhibit the expression of p-IκBα and p-P65 proteins and CD8⁺ T cells produce cytokines

A: Immunoblot analysis of SNX9, TOX, p-IκBα and p-P65 protein expression in CD8⁺ T cells. B, C: ELISpot were used to detect the ability of CD8⁺ T cells to secrete cytokines IFN-γ and TNF-α. Stimulate CD8⁺ T cells with αCD3/CD28 and co-culture with tumor cells in the presence of anti-SNX9 antibodies, anti-PD-1 blocking antibodies, or isotype controls. D: Immunoblot analysis of SNX9, TOX, p-IκBα and p-P65 protein expression in CD8⁺ T cells. E, F: ELISpot were used to detect the ability of CD8⁺ T cells to secrete cytokines IFN-γ and TNF-α. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

3 讨论

目前, 针对PD-1/PD-L1的ICB疗法仅在部分CC患者中诱导了显著的临床反应, 大多数CC患者仍然不能从这种治疗方案中获益, 其原因可能

是肿瘤微环境中的慢性抗原刺激, 导致肿瘤特异性CD8⁺ T细胞进入衰竭状态, 导致效应细胞因子(如IFN-γ)的产生受损, 进而限制了ICB的治疗效果^[8-12]。本研究旨在了解免疫治疗耐药性背后的免疫逃逸机制, 并发现CD8⁺SNX9⁺ T细胞具有

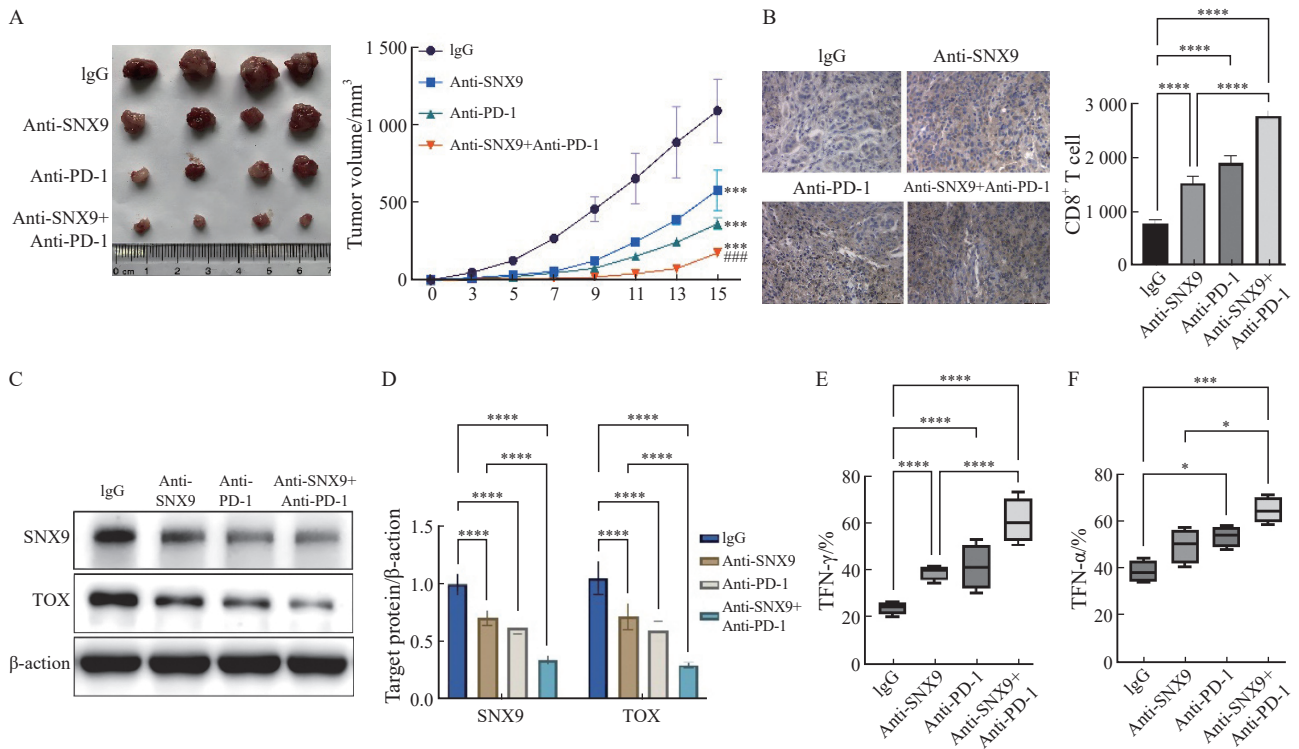


图5 SNX9抑制对C57BL/6小鼠移植性宫颈肿瘤的生长和CD8⁺T淋巴细胞的功能影响

Fig.5 Effects of SNX9 inhibition on the growth of transplanted cervical tumor and the function of CD8⁺T lymphocytes in C57BL/6 mice

A: Analysis of tumor progression in WT-U14 cell transplantation mice treated with PD-1 blocking antibody, SNX9 blocking antibody, or isotype control. B: Immunohistochemical analysis of CD8⁺T cell infiltration levels in mouse tumor tissues (DAB staining, magnification 200×). C: Immunoblot analysis of SNX9 and TOX protein expression in tumor tissues. D, E: ELISpot were used to detect the ability of CD8⁺T cells in mice receiving different treatments to secrete TNF-α and IFN-γ. *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001; ****: P<0.0001.

低效应子功能和抗肿瘤能力，阻断SNX9表达提高了CD8⁺T细胞分泌细胞因子IFN-γ、TNF-α的能力，表明SNX9可作为CC免疫治疗的潜在靶点。

近年来，SNX9/TOX作为一个新的免疫检查点和肿瘤免疫治疗的潜在靶点引起了广泛关注^[13]。SNX9是一类包含PX结构域的高度保守真核生物蛋白，其功能主要是参与负载蛋白的内吞、分选和降解过程，以维持细胞信号的稳态和平衡。先前研究^[14]发现，敲除SNX9有助于改善T细胞的效应功能和记忆分化，从而增强包括嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞在内的过继性T细胞疗法的抗肿瘤效果。近年来，SNX9在CD8⁺T细胞介导的免疫抑制中的调控作用逐渐受到关注，但其与TOX的协同作用在CC微环境中的功能及机制仍有待研究。本研究表明，SNX9在CC患者肿瘤组织的CD8⁺T细胞中上调。与正常宫颈组织相比，PBMC和CC组织中CD8⁺SNX9⁺T细胞数量显著增加。此外，SNX9与CC患者PBMC中CD8⁺T细胞上的PD-1、LAG3、Tim3表达呈正相关，表明SNX9与其他免疫检查点的共表达可能导致CD8⁺T细胞耗竭。

TOX是SNX9的配体，以高亲和力与SNX9相

互作用，其表达与T细胞衰竭有关^[7]。敲低宿主和肿瘤来源的TOX表达能够抑制肿瘤的生长和转移，并增加对免疫治疗的反应^[15]。本研究结果显示，TOX在CC肿瘤组织中的表达高于正常组织，与CC组织中SNX9升高和CD8⁺T细胞水平降低具有显著相关性，这些发现与之前报道^[16]的TOX在CC患者的血浆和组织中高水平表达并与CC进展相关的发现一致。此外，本研究发现在用Fc-TOX处理的CD8⁺T细胞上，SNX9水平显著上调，并且SNX9阻断了CD8⁺T细胞的核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)表达和细胞因子分泌。NF-κB是一种关键的转录因子，控制各种免疫细胞中细胞因子的产生^[17]。先前的研究^[18]表明，CC中CD8⁺T细胞衰竭与NF-κB信号通路抑制有关。这些发现表明SNX9/TOX信号通路的激活可能通过抑制NF-κB炎症因子激活进而抑制CD8⁺T细胞的免疫功能。

目前大多数缓解T细胞衰竭的方法旨在增加共刺激或减少共抑制^[19]。另外，越来越多的证据^[20-21]表明，抗原刺激过程中缺乏共抑制会导致T细胞衰竭。这些发现提示共刺激的最佳平衡是实现和维持功能性肿瘤特异性效应T细胞所必需的。有研究^[22]发现，SNX9敲低能够诱导

NFAT信号少量减少, 可作为微调T细胞活化的一种有前景的方法。本研究证实与单独靶向任一检查点相比, 联合阻断SNX9和PD-1能够进一步增强荷瘤小鼠的免疫反应并抑制肿瘤生长。因此, PD-1和SNX9抑制剂的组合可能是CC的一种有效治疗方法。

本研究存在一定局限性。纳入样本量较小、体内实验小鼠出现死亡等因素, 可能对研究结果产生统计学偏倚, 影响统计学结果的可信度。未来应针对上述不足, 扩大样本量, 验证SNX9/TOX信号通路作为CC免疫治疗的潜在靶点的可行性。

综上所述, SNX9/TOX信号通路在CC患者和小鼠模型中表现出增强的活性, 并且与免疫抑制有关。抑制SNX9/TOX信号通路可能是CC的潜在治疗策略。

第一作者:

刘丹 (ORCID: 0009-0005-6974-2488), 硕士, 主治医师。

通信作者:

张谷香, 学士, 主任医师, E-mail: ttshlx0@163.com。

作者贡献声明:

刘丹: 文章的构思与设计, 撰写论文, 论文修订; 张谷香, 谢丹, 徐艳: 资料收集, 资料整理, 实验操作; 谢诚芳: 统计学处理; 唐雨曦: 文章的质量控制及审校, 对文章整体负责, 监督管理。

[参 考 文 献]

- [1] HUANG J J, DENG Y Y, BOAKYE D, et al. Global distribution, risk factors, and recent trends for cervical cancer: a worldwide country-level analysis [J] . *Gynecol Oncol*, 2022, 164(1): 85–92.
- [2] SINGH D, VIGNAT J, LORENZONI V, et al. Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative [J] . *Lancet Glob Health*, 2023, 11(2): e197–e206.
- [3] LIU L, WANG A H, LIU X L, et al. Blocking TIGIT/CD155 signalling reverses CD8⁺ T cell exhaustion and enhances the antitumor activity in cervical cancer [J] . *J Transl Med*, 2022, 20(1): 280.
- [4] SHARMA P, GOSWAMI S, RAYCHAUDHURI D, et al. Immune checkpoint therapy—current perspectives and future directions [J] . *Cell*, 2023, 186(8): 1652–1669.
- [5] LORUSSO D, XIANG Y, HASEGAWA K, et al. Pembrolizumab or placebo with chemoradiotherapy followed by pembrolizumab or placebo for newly diagnosed, high-risk, locally advanced cervical cancer (ENGOT-cx11/GOG-3047/KEYNOTE-A18): a randomised, double-blind, phase 3 clinical trial [J] . *Lancet*, 2024, 403(10434): 1341–1350.
- [6] OAKNIN A, MOORE K, MEYER T, et al. Nivolumab with or without ipilimumab in patients with recurrent or metastatic cervical cancer (CheckMate 358): a phase 1–2, open-label, multicohort trial [J] . *Lancet Oncol*, 2024, 25(5): 588–602.
- [7] TREFNY M P, KIRCHHAMMER N, DER MAUR P A, et al. Deletion of SNX9 alleviates CD8 T cell exhaustion for effective cellular cancer immunotherapy [J] . *Nat Commun*, 2023, 14(1): 86.
- [8] PHILIP M, SCHIETINGER A. CD8⁺ T cell differentiation and dysfunction in cancer [J] . *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(4): 209–223.
- [9] CHEN J, SONG Y, MIAO F, et al. PDL1-positive exosomes suppress antitumor immunity by inducing tumor-specific CD8⁺ T cell exhaustion during metastasis [J] . *Cancer Sci*, 2021, 112(9): 3437–3454.
- [10] BAI R L, LV Z, XU D S, et al. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors [J] . *Biomark Res*, 2020, 8: 34.
- [11] MAKUKU R, KHALILI N, RAZI S, et al. Current and future perspectives of PD-1/PDL-1 blockade in cancer immunotherapy [J] . *J Immunol Res*, 2021, 2021: 6661406.
- [12] WANG Y Z, WANG J S, DU J, et al. Clinical benefit analysis of PD-1 inhibitors in patients with advanced, recurrent or metastatic cervical cancer: a meta-analysis and systematic review [J] . *Front Immunol*, 2024, 15: 1305810.
- [13] LEE J B, KHAN D H, HURREN R, et al. Venetoclax enhances T cell-mediated antileukemic activity by increasing ROS production [J] . *Blood*, 2021, 138(3): 234–245.
- [14] WEI W, CHEN Z N, WANG K. CRISPR/Cas9: a powerful strategy to improve CAR-T cell persistence [J] . *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12317.
- [15] NIU H Y, WANG H Q. TOX regulates T lymphocytes differentiation and its function in tumor [J] . *Front Immunol*, 2023, 14: 990419.
- [16] AHMAD A, ANSARI I A. Carvacrol exhibits chemopreventive potential against cervical cancer cells *via* caspase-dependent apoptosis and abrogation of cell cycle progression [J] . *Anticancer Agents Med Chem*, 2021, 21(16): 2224–2235.
- [17] FENG X, SHAN R, HU X M. The linkage of NF- κ B signaling pathway-associated long non-coding RNAs with tumor microenvironment and prognosis in cervical cancer [J] . *BMC Med Genomics*, 2023, 16(1): 169.
- [18] WANG D J, ZOU F, LI Y, et al. Targeting MELK improves PD-1 blockade efficiency in cervical cancer *via* enhancing antitumor immunity [J] . *Mol Ther Oncol*, 2024, 32(1): 200759.
- [19] BORST J, BUSSELAAR J, BOSMA D M T, et al. Mechanism of action of PD-1 receptor/ligand targeted cancer immunotherapy [J] . *Eur J Immunol*, 2021, 51(8): 1911–1920.
- [20] 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.
- [21] CILLO A R, CARDELLO C, SHAN F, et al. Blockade of LAG-3 and PD-1 leads to co-expression of cytotoxic and exhaustion gene modules in CD8⁺ T cells to promote antitumor immunity [J] . *Cell*, 2024, 187(16): 4373–4388.e15.
- [22] ECKER M, SCHREGLE R, KAPOOR-KAUSHIK N, et al. SNX9-induced membrane tubulation regulates CD28 cluster stability and signalling [J] . *eLife*, 2022, 11: e67550.

(收稿日期: 2024-10-23 修回日期: 2025-02-06)

(责任编辑: 李广涛)