

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2025.12.017

论著 · 临床

人体乳头瘤状病毒 16 E6/E7 介导的 circRNA 与宫颈癌临床病理关系分析

马依努尔 · 艾肯, 热依兰木 · 买赛地, 范玲玲, 韩莉莉



基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(2022B03018-1); 新疆维吾尔自治区人民医院院内项目(20200215)

作者单位: 830001 乌鲁木齐, 新疆维吾尔自治区人民医院妇科医学诊疗中心

通信作者: 韩莉莉, E-mail: hanliliabcd@163.com

【摘要】 目的 探讨人体乳头瘤状病毒(HPV)16 E6/E7 介导的环状 RNA(circRNA)与宫颈癌(CC)临床病理特征的关系。**方法** 选取 2021 年 6 月—2024 年 6 月新疆维吾尔自治区人民医院妇科医学诊疗中心 HPV-16 检测阳性的 CC 患者 37 例为研究对象, 取患者癌组织及癌旁组织病理样本。采用 RT-PCR 法检测差异 circRNA 水平, 并分析其与临床及病理资料之间的相关性。选择正常宫颈 HeceRopic 细胞培养后植入 HPV-16 E6/E7, 确定 HPV-16 E6/E7 过表达后采用 RNA 转录组测序技术结合生物信息学分析寻找差异 circRNA。**结果** 基于数据库中释放的蛋白编码基因及转录本的注释信息, 通过位置信息比对发现 HeceRopic 细胞中包含的 circRNA 共计 5 584 个, 应用 E6/E7 过表达慢病毒转染到 HeceRopic 细胞筛选出 445 个差异表达 circRNA, 其中上调 296 个, 下调 149 个($P < 0.05$)。HeceRopic 细胞经 HPV-16 E6/E7 转染后差异 circRNA 的 GO 功能分析发现差异显著富集条目主要涉及核质运输、蛋白质定位至细胞核、内质网膜及蛋白酶体等方面, HeceRopic 细胞经 HPV-16 E6/E7 转染后差异 circRNA 的 KEGG 分析有 7 条显著差异性富集信号通路($P < 0.05$); 最终得出 3 个候选差异表达 circRNA, 分别为表达上调 2 个: hsa_circ_0052602, hsa_circ_0051620, 表达下调 1 个: hsa_circ_0038475。HPV-16 阳性 CC 癌组织 hsa_circ_0052602, hsa_circ_0051620 表达水平显著高于癌旁组织, hsa_circ_0038475 表达水平显著低于癌旁组织($t/P = 11.629 / < 0.001, 11.776 / < 0.001, 8.709 / < 0.001$); FIGO 分期Ⅲ期、肿瘤低分化、淋巴结转移 CC 患者 hsa_circ_0052602, hsa_circ_0051620 表达水平显著高于 FIGO 分期 I ~ II 期、肿瘤中高分化、无淋巴结转移患者, hsa_circ_0038475 表达水平显著低于 FIGO 分期 I ~ II 期、肿瘤中高分化、无淋巴结转移患者($t/P = 5.408 / < 0.001, 3.076 / < 0.001, 5.884 / < 0.001$; hsa_circ_0051620: $t/P = 5.603 / < 0.001, 3.320 / 0.002, 5.558 / < 0.001$; hsa_circ_0038475: $t/P = 2.792 / 0.008, 2.372 / 0.031, 2.895 / 0.006$); hsa_circ_0052602 及 hsa_circ_0051620 是高 FIGO 分期, 低分化 CC、淋巴结转移的独立危险因素[hsa_circ_0052602: OR(95%CI) = 3.636(1.296 ~ 10.201), 25.954(2.307 ~ 291.997), 12.159(2.413 ~ 61.275); hsa_circ_0051620: OR(95%CI) = 2.545(1.127 ~ 5.745), 8.271(1.583 ~ 43.221), 2.405(1.033 ~ 5.589)], hsa_circ_0038475 高则是高 FIGO 分期、低分化 CC、淋巴结转移的独立保护因素[hsa_circ_0038475: OR(95%CI) = 0.344(0.132 ~ 0.902), 0.063(0.005 ~ 0.739), 0.162(0.031 ~ 0.865)]。**结论** HPV-16 E6/E7 介导的 circRNA(hsa_circ_0052602, hsa_circ_0051620, hsa_circ_0038475)分别与 CC 患者的高 FIGO 分期、低分化程度及淋巴结转移之间存在显著相关性。

【关键词】 宫颈癌; 人体乳头瘤状病毒; circRNA; E6 蛋白; E7 蛋白; 临床病理特征

【中图分类号】 R737.33

【文献标识码】 A

Analysis of the relationship between HPV16 E6/E7-mediated circRNA and the clinicopathological features of cervical cancer Mayinuer · Aiken, Reyilanmu · Maisaidi, Fan Lingling, Han Lili. Gynecological Medical Diagnosis and Treatment Center, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Xinjiang, Urumqi 830001, China

Funding program: Project of Key Research and Development Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022B03018-1); Intramural Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital (20200215)

Corresponding author: Han Lili, E-mail: hanliliabcd@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between human papillomavirus (HPV) 16 E6/E7-mediated circular RNA (circRNA) and the clinicopathological features of cervical cancer (CC). **Methods** Normal cervical HeceRopic cells were cultured and divided into a transfection group and a blank control group. HPV16 E6/E7 was introduced into the transfection group, and RNA transcriptome sequencing combined with bioinformatics analysis was performed to identify differentially

expressed circRNAs after confirming HPV16 E6/E7 overexpression. A total of 37 patients with cervical cancer who visited the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region from June 2021 to June 2024 were selected. The lesions and paracancerous tissues of all patients were collected. RT-PCR was used to detect the levels of differential circRNAs, and their correlations with clinical and pathological data were analyzed. **Results** Based on protein-coding gene and transcript annotation information from databases, 5,584 circRNAs were identified in HcerEpic cells through positional alignment. After transfection with HPV16 E6/E7-overexpressing lentivirus, 445 differentially expressed circRNAs were screened (296 upregulated and 149 downregulated, $P<0.05$). GO functional analysis revealed that these circRNAs were significantly enriched in nucleocytoplasmic transport, protein localization to the nucleus, endoplasmic reticulum membrane, and proteasome processes. Pathway analysis identified 7 significantly enriched signaling pathways ($P<0.05$). Three candidate circRNAs were ultimately selected: two upregulated (hsa_circ_0052602 and hsa_circ_0051620) and one downregulated (hsa_circ_0038475). The expression levels of hsa_circ_0052602 and hsa_circ_0051620 in the HPV-16 positive cervical cancer group were significantly higher than those in paracancerous tissues. The expression level of hsa_circ_0038475 was significantly lower than that in paracancerous tissues ($t/P=11.629/<0.001, 11.776/<0.001, -8.709/<0.001$). Patients with FIGO stage III, poorly differentiated tumors, or lymph node metastasis had significantly higher expression levels of hsa_circ_0052602 and hsa_circ_0051620 than those with FIGO stage I-II, moderately/well-differentiated tumors, or no lymph node metastasis (hsa_circ_0052602: $t/P=-5.408/<0.001, 3.076/<0.001, 5.884/<0.001$; hsa_circ_0051620: $t/P=-5.603/<0.001, 3.320/0.002, 5.558/<0.001$). Conversely, the expression level of hsa_circ_0038475 was significantly lower in patients with FIGO stage III, poorly differentiated tumors, or lymph node metastasis than in those with FIGO stage I-II, moderately/well-differentiated tumors, or no lymph node metastasis ($t/P=2.792/0.008, -2.372/0.031, -2.895/0.006$). hsa_circ_0052602 and hsa_circ_0051620 are independent risk factors for high FIGO stage [$OR(95\% CI)=3.636(1.296-10.201), 2.545(1.127-5.745)$], poorly differentiated CC [$OR(95\% CI)=25.954(2.307-291.997), 8.271(1.583-43.221)$] and lymph node metastasis [$OR(95\% CI)=12.159(2.413-61.275), 2.405(1.033-5.589)$]. Conversely, high expression of hsa_circ_0038475 was an independent protective factor against higher FIGO stage, poorly differentiated cervical cancer, and lymph node metastasis [$OR(95\% CI)=0.344(0.132-0.902), 0.063(0.005-0.739), 0.162(0.031-0.865)$]. **Conclusion** HPV16 E6/E7-mediated circRNAs (hsa_circ_0052602, hsa_circ_0051620, and hsa_circ_0038475) are significantly correlated with advanced FIGO stage and lymph node metastasis in CC patients.

[Key words] Cervical cancer; Human papillomavirus; circRNA; E6 protein; E7 protein; Clinicopathological features

高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)16型感染是宫颈癌(cervical cancer, CC)发生发展的核心驱动因素,其编码的E6和E7癌蛋白通过靶向降解p53和pRb等抑癌蛋白,导致细胞周期紊乱和基因组不稳定性^[1-2]。近年来研究发现,HPV-16 E6/E7不仅通过经典致癌通路发挥作用,还能通过调控非编码RNA网络重塑肿瘤微环境^[3]。其中,环状RNA(circRNA)因其独特的闭合环状结构及高度稳定性,逐渐成为肿瘤表观遗传调控领域的研究热点^[4]。然而,现有研究多聚焦于单一circRNA的功能验证,对E6/E7介导的circRNA调控网络及其与临床病理特征的系统性关联仍缺乏深入解析^[5]。本研究旨在系统阐明HPV-16 E6/E7特异性调控的circRNA分子谱,为完善CC的临床诊疗工作提供参考,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取2021年6月—2024年6月新疆维吾尔自治区人民医院妇科医学诊疗中心HPV-16检测阳性的CC患者37例为研究对象,取患者癌组织及癌旁组织病理样本。患者年龄48~78(63.56±8.22)

岁;肿瘤大小:<4.0 cm 13例,≥4.0 cm 24例;吸烟史5例,饮酒史2例;高血压7例,糖尿病3例,家族遗传史6例;肿瘤分化程度:低分化16例,中/高分化21例;淋巴结转移12例;国际妇产科联盟(FIGO)分期:I期8例,II期15例,III期14例。本研究已获得医院伦理委员会批准(KY20210512136),患者或家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1)纳入标准:①患者活检或手术切除标本经病理学诊断为CC;②患者首次发病,临床病历资料完整;③切除前行HPV检测显示HPV-16阳性。(2)排除标准:①合并其他器官恶性肿瘤者;②合并肝肾功能障碍者;③合并免疫系统疾病及血液系统疾病者;④术前接受过放疗、化疗及生物治疗;⑤服用过激素类药物。

1.3 研究方法

1.3.1 HPV-16 E6/E7介导的circRNA筛选:(1)人宫颈上皮HcerEpic细胞(华拓生物科技有限公司,货号:HTX-0516)培养:采用RPMI-1640培养基+10%FBS+双抗(以上均购自ThermoFisher公司)对人宫颈上皮

HcerEpic 细胞进行培养。培养条件:温度 37℃, 5% CO₂, 细胞培养完成后分成 2 份。(2)构建 HPV-16 E6/E7 过表达慢病毒载体:载体构建由上海吉凯基因生物公司完成,应用 E6/E7 过表达慢病毒转染到 HcerEpic 细胞中。(3)差异 circRNA 筛选:样品提取总 RNA 后,去除总 RNA 中的 rRNA 和线性 RNA 分子,向得到的 circRNA 中加入裂解缓冲液使其片段成为短片段,再以短片段 circRNA 为模板,用六碱基随机引物(random hexamers)合成 cDNA 第一链,并加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I(以上均购自 ThermoFisher 公司)合成 cDNA 第二链,经过 QiaQuick PCR 试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱,经末端修复、加碱基 A,加测序接头,再经琼脂糖凝胶电泳回收目的大小片段,并进行 PCR 扩增,从而完成整个文库制备工作,构建好的文库用 Illumina HiSeq2000 (ILLUMINA SINGAPORE PTE.LTD 生产)进行测序并获得 HcerEpic 细胞 circRNA 表达谱。而后通过火山图及热图分析,筛选出差异表达 circRNA,并根据条件($\log_2 FC > 0.5$ 且校正 P 值 < 0.05)对差异基因 P 值进行排序后选取排名前三的基因作为本次研究的靶基因,再应用 Target Scan、miRBase 等在线数据库对 HPV-16 E6/E7 介导的 circRNA 互作进行 GO 分析筛选,最后应用 KEGG 通路分析筛选排名前 10 的信号通路。

1.3.2 不同 HPV-16 中 circRNA 检测:术后 3 d 内对 CC 患者癌组织和癌旁组织中的 circRNA 表达进行分析,应用 Trizol 法提取 CC 患者组织总 RNA,应用反转录试剂盒合成 cDNA, PrimeScript RT 试剂盒及 Trizol 试剂盒购自赛默飞生物公司,并设计相关引物序列,进行 circRNA 扩增反应。PCR 反应体系:circDNA 底物 2.33 μl, TaqMan 2 × Universal PCR Master Mix 10.00 μl, dd H₂O 7.67 μl, 反应体系共计 20 μl。PCR 反应条件:94℃ 预变性 10 min、94℃ 变性 5 s、55℃ 退火 30 s、70℃ 延伸 30 s, 共计 40 次循环。circRNA 以 GAPDH 为内参,所有引物均在 circBank 中获取序列信息,并进行跨接点引物设计,最终验证和优化得出序列,引物均由上海欧易生物医学科技有限公司设计完成,引物序列见表 1。设置 3 个复孔,重复 3 次标准实验,应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 circRNA 的相对表达量。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用独立样本 t 检验;筛选出差异 circRNA 后,采用多因素 Logistic 回归分析临床及病理资料中与其相关的因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 circRNA 及内参基因引物序列

Tab.1 Primer sequences for circRNA and internal reference genes

基因	上游引物	下游引物
hsa_circ_0052602	5'-CATGCATACTAAT-TCGGCACTT-3'	5'-ACTGTACCTCCTTCT-TGCTTAG-3'
hsa_circ_0051620	5'-GATACCCAAAGGC-TCCCAGTT-3'	5'-TCACTTGAGACTGCC-AGTATGCG-3'
hsa_circ_0038475	5'-CGTCTAGCAGTAT-GTCTACACCAGC-3'	5'-ACTGCTTCTCTGCGT-TCGCACA-3'
GAPDH	5'-GATTCCACCCATG-GCAAATTC-3'	5'-CTGGAAGATGGTGAT-GGGATT-3'

2 结 果

2.1 HcerEpic 细胞中 circRNA 筛选 基于数据库中释放的蛋白编码基因及转录本的注释信息,通过位置信息比对发现 HcerEpic 细胞中包含的 circRNA 共计 5 584 个,其长度分布见图 1。利用 CIRI 软件将预测得到的 circRNA 与已知数据库 circbase 中的 87 941 个 circRNA 进行比较,发现本次 HcerEpic 细胞中的 circRNA 包含 3 556 个已知 circRNA 的信息,见图 2。根据 circRNA 在基因组上的位置,可以将 circRNA 分为外显子 circRNA、内含子 circRNA、反义 circRNA、义重叠 circRNA、基因间 circRNA,其分布情况见图 3。

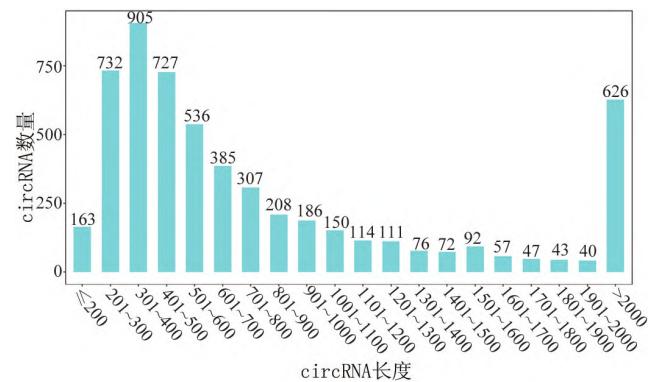


图 1 HcerEpic 细胞经 HPV-16 E6/E7 转染后包含的 circRNA 序列长度分布图

Fig.1 Distribution of circRNA sequence lengths contained in HcerEpic cells after transfection with HPV-16 E6/E7

2.2 HcerEpic 细胞经 HPV-16 E6/E7 转染后差异 circRNA 筛选 应用 E6/E7 过表达慢病毒转染到 HcerEpic 细胞经 RNA-seq 技术检测 circRNA,获得 circRNA 表达谱,再通过火山图及热图分析,筛选出 445 个差异表达 circRNA,其中上调 296 个,下调 149 个($P < 0.05$),GO 功能富集分析显示,HcerEpic 细胞经 HPV-16 E6/E7 转染后差异 circRNA 的 GO 功能分析差异显著,富集条目按照对应的 $-\log_{10}P\text{value}$ 排序选

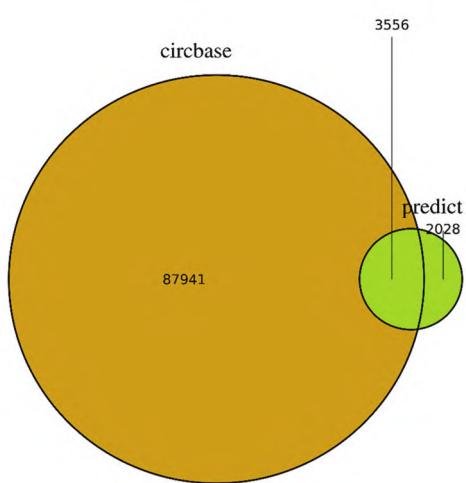


图 2 鉴定得到的 HeerEpic 细胞中 circRNA 与已知数据库中 circRNA 比较

Fig.2 Comparison of circRNAs in identified HeerEpic cells with those in known databases

取前 30 个, 分别包含生物过程 (biological-process, BP)、细胞组分 (cellular-components, CC) 及分子功能 (molecular-function, MF) 排名的前 10 位, 主要涉及核质运输、蛋白质定位至细胞核、内质网膜及蛋白酶体等方面, 见图 4。HeerEpic 细胞经 HPV-16 E6/E7 转染后差异 circRNA 的 KEGG 分析有 7 条显著差异性富集信号通路 ($P < 0.05$), 包括抗吞噬作用 (anti-phagocytosis)、肌动蛋白细胞骨架调节 (regulation of

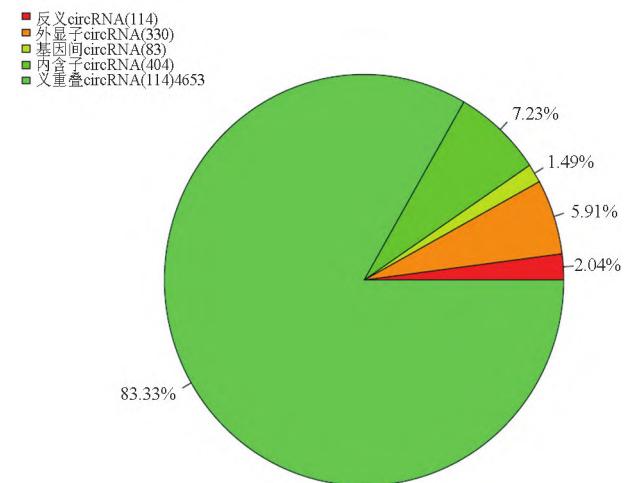


图 3 circRNA 基因结构分布图

Fig.3 Distribution map of circRNA gene structure

actin cytoskeleton)、肌动蛋白细胞骨架重排 (actin cytoskeleton rearrangement)、抑制焦亡 (inhibition of pyroptosis)、抑制促炎反应 (inhibition of pro-inflammatory response)、抑制干扰素反应 (inhibition of interferon response)、免疫细胞反应受损 (impaired immune cell response)。通过以上步骤, 最终得出 3 个候选差异表达 circRNA, 分别为表达上调 2 个: hsa_circ_0052602, hsa_circ_0051620, 表达下调 1 个: hsa_circ_0038475。

2.3 HPV-16 E6/E7 介导的差异 circRNA 在 HPV-16 阳性 CC 癌组织和癌旁组织中的表达 RT-PCR 显示,

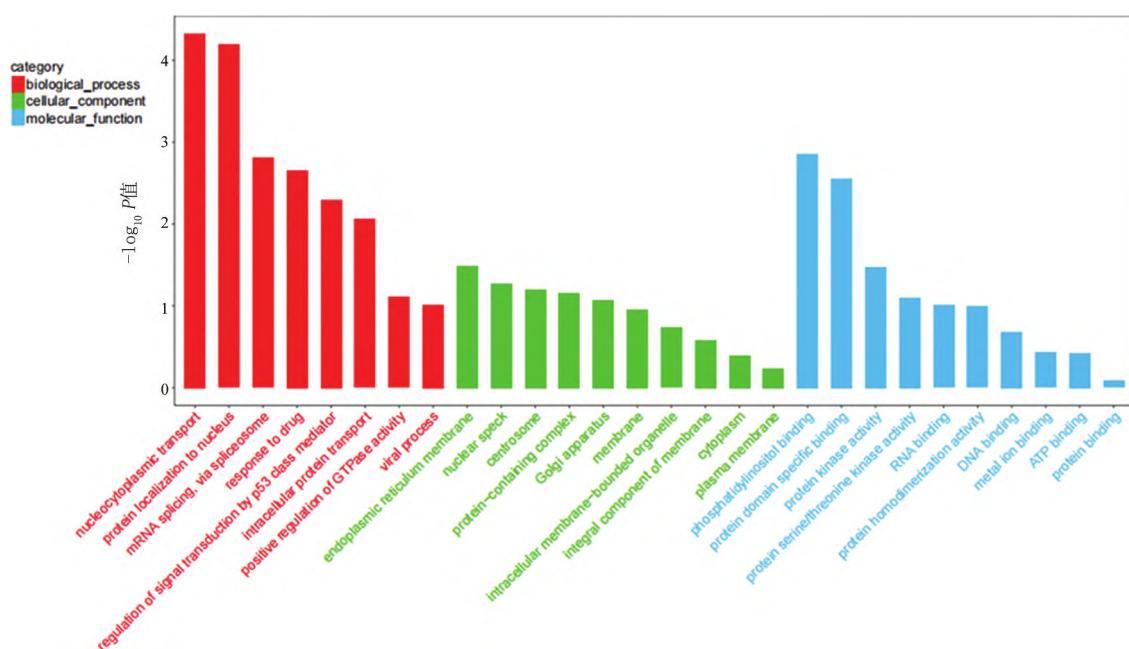


图 4 HeerEpic 细胞经 HPV-16 E6/E7 转染后 circRNA 差异表达的 GO 功能分析

Fig.4 GO functional analysis of differential expression of circRNA in HeerEpic cells after transfection with HPV-16 E6/E7

HPV-16 阳性 CC 癌组织 hsa_circ_0052602、hsa_circ_0051620 表达水平显著高于癌旁组织, hsa_circ_0038475 表达水平显著低于癌旁组织 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 HPV-16 E6/E7 介导的差异 circRNA 在 HPV-16 阳性 CC 癌组织和癌旁组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of the expression of HPV-16 E6/ E7-mediated differential circRNAs in HPV-16 positive cervical cancer tissues and adjacent tissues

组别	例数	hsa_circ_0052602	hsa_circ_0051620	hsa_circ_0038475
癌旁组织	37	1.03±0.08	1.01±0.05	0.99±0.05
癌组织	37	2.51±0.77	2.33±0.68	0.75±0.16
<i>t</i> 值		11.629	11.776	8.709
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 HPV-16 E6/E7 介导的 circRNA 表达在不同临床/病理特征中的差异比较 FIGO 分期Ⅲ期、肿瘤低分化、淋巴结转移 CC 患者 hsa_circ_0052602、hsa_circ_0051620 表达水平显著高于 FIGO 分期 I ~ II 期、肿瘤中高分化、无淋巴结转移患者, hsa_circ_0038475 表达水平显著低于 FIGO 分期 I ~ II 期、肿瘤中高分化、无

淋巴结转移患者 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 见表 3。

2.5 多因素 Logistic 回归分析差异 circRNA 表达水平对 CC 临床病理特征的影响 以 FIGO 分期(赋值:Ⅲ期为“1”; I ~ II 期为“0”)、肿瘤分化程度(赋值:低分化为“1”; 中/高分化为“0”)及淋巴结转移(赋值:是为“1”; 否为“0”)分别为因变量, HPV-16 E6/E7 介导的 3 个差异 circRNA 表达水平为自变量(录入实测值)进行多因素 Logistic 回归分析, 结果显示: hsa_circ_0052602 及 hsa_circ_0051620 表达水平高是高 FIGO 分期、低分化 CC、淋巴结转移的独立危险因素, hsa_circ_0038475 表达水平高为独立保护因素 ($P < 0.05$), 见表 4。

3 讨论

HPV-16 E6/E7 癌蛋白介导的 circRNA 调控网络在 CC 发生发展中的作用机制及其临床关联性研究, 现已成为肿瘤分子病理学领域的前沿热点^[6]。国内外研究表明, E6/E7 蛋白通过表观遗传修饰、RNA 结合蛋白互作等途径特异性调控宿主 circRNA 的异常环化, 形成致瘤性 ceRNA 网络, 进而影响 CC 的临床病理进程^[7]。HPV-16 E6/E7 诱导的 circRNA 失调被证实与肿瘤分期、分化程度及淋巴转移显著相关^[8]。机制

表 3 HPV-16 E6/E7 介导的 circRNA 表达在 CC 患者不同临床/病理特征中的差异比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of the differences in HPV-16 E6/ E7-mediated circRNA expression in different clinical/pathological conditions of cervical cancer

项 目	例数	hsa_circ_0052602	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	hsa_circ_0051620	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	hsa_circ_0038475	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	
年龄	<60岁	15	2.48±0.84	0.189	0.851	2.37±0.74	0.239	0.812	0.73±0.19	0.522	0.606
	≥60岁	22	2.53±0.71			2.31±0.76			0.76±0.14		
肿瘤大小	<4.0 cm	13	2.47±0.79	0.279	0.781	2.31±0.74	0.129	0.879	0.77±0.19	0.871	0.392
	≥4.0 cm	24	2.54±0.68			2.34±0.61			0.72±0.14		
FIGO 分期	I ~ II 期	23	2.24±0.81	2.349	0.026	1.94±0.64	2.962	0.006	0.84±0.18	2.970	0.009
	III期	14	2.91±0.86			2.68±0.79			0.67±0.12		
肿瘤分化程度	低	16	3.11±0.84	3.282	0.004	2.76±0.74	3.037	0.005	0.65±0.14	3.501	0.001
	中/高	21	2.04±0.81			2.06±0.63			0.84±0.19		
淋巴结转移	有	12	3.28±0.91	3.980	<0.001	2.71±0.72	2.592	0.017	0.68±0.17	4.779	<0.001
	无	25	2.03±0.86			2.08±0.63			0.82±0.16		

表 4 多因素 Logistic 回归分析差异 circRNA 表达水平对 CC 临床病理特征的影响

Tab.4 Logistic regression analysis of the influencing factors of the clinicopathological characteristics of cervical cancer

自变量	因变量	β 值	SE 值	Wald 值	<i>P</i> 值	OR 值	95%CI
hsa_circ_0052602	FIGO 分期	1.291	0.526	6.013	0.014	3.636	1.296~10.201
	肿瘤分化程度	3.256	1.235	6.953	0.008	25.954	2.307~291.997
	淋巴结转移	2.498	0.825	9.164	0.002	12.159	2.413~61.275
hsa_circ_0051620	FIGO 分期	0.934	0.415	5.055	0.025	2.545	1.127~5.745
	肿瘤分化程度	2.113	0.844	6.271	0.012	8.271	1.583~43.221
	淋巴结转移	0.876	0.431	4.139	0.042	2.405	1.033~5.589
hsa_circ_0038475	FIGO 分期	-1.066	0.491	4.711	0.030	0.344	0.132~0.902
	肿瘤分化程度	-2.751	1.249	4.853	0.028	0.063	0.005~0.739
	淋巴结转移	-1.817	0.853	4.535	0.033	0.162	0.031~0.865

层面,circRNA 通过吸附 miRNA 调控关键信号通路(如 PI3K/AKT、Wnt/β-catenin),增强 EMT 表型并促进基质浸润^[9]。部分 circRNA 已被鉴定为独立预后标志物,其表达水平与放化疗敏感性相关,最新研究聚焦于 circRNA 与 E6/E7 协同调控基因组不稳定性及免疫逃逸的分子机制^[10-11]。国内研究则侧重于临床样本验证及功能网络解析,发现 circ_0000745、circRNA_0020397 等分子可反映宫颈病变程度,其异常表达与盆腔淋巴结转移、脉管浸润等高风险病理特征密切关联^[12]。值得注意的是,国内有研究揭示了 circRNA-FOXO3 通过调控自噬流增强肿瘤细胞存活的病理机制^[13]。当前研究的局限性在于 circRNA 动态调控网络的时空异质性尚未阐明,且缺乏标准化的临床检测体系。未来研究需整合单细胞测序与类器官模型,深入解析 E6/E7-circRNA 轴在 CC 个体化治疗中的转化价值。

本研究基于 circRNA 反向剪接位点的基因组坐标比对,在 HcerEpic 宫颈上皮细胞系中系统鉴定了 5 584 种 circRNA,提示该细胞系具有高度复杂的环状转录组特征。此数据符合国际主流研究对永生化上皮细胞 circRNA 丰度的报道,其数量级验证了实验体系建库深度及 circFinder 算法的可靠性^[14]。本研究采用 CIRI 算法基于 circRNA 反向剪接位点特征进行预测,并通过 circBase 数据库进行交叉验证,证实 HcerEpic 细胞中 3 556 个 circRNA 具有基因组坐标保守性。此结果表明保守 circRNA 的宿主基因显著富集于 RNA 剪切和细胞周期检查点等关键通路,与 CC 病变模型中异常剪接事件的生物学特征吻合;数据库匹配率验证了测序深度及 CIRI 参数优化的有效性(假阳性率<5%),为后续差异 circRNA 筛选奠定可靠性基础。通过对 HPV-16 E6/E7 癌蛋白介导的差异 circRNA(hsa_circ_0052602、hsa_circ_0051620 及 hsa_circ_0038475)进行 GO 分析显示,BP 层面:三者显著富集核质转运(GO: 0051169)、蛋白酶体组装(GO: 0043248)及内质网—核信号调控(GO: 0036503),提示其通过结合核转运受体(如 Importin-α)或调控 Ubiquitin ligase 复合体影响蛋白核定位^[15]。CC 层面:靶向定位于核孔复合体(GO: 0005643)、内质网膜腔面(GO: 0098556)及 26S 蛋白酶体调节亚基(GO: 0034515),与 circRNA 介导的核膜—ER 互作及泛素化降解途径空间定位一致^[16]。MF 层面:验证显示 hsa_circ_0052602 直接结合 PSMD1(蛋白酶体亚基)mRNA 增强其稳定性^[17]。以上网络可能构成 HPV 致癌蛋白调控核质稳态的关键补偿机制。同时 hsa_circ_

0051620 通过吸附 miR-27a-3p 上调 ARPC3(肌动蛋白相关蛋白复合体亚基),增强肿瘤细胞皮层肌动蛋白密度,形成物理屏障阻碍巨噬细胞突触形成^[18]。hsa_circ_0052602 直接结合 RhoGEF 蛋白 mRNA,激活 RhoA/ROCK 通路,诱导应力纤维组装并抑制膜皱褶形成,阻断 NK 细胞介导的细胞毒性^[19]。hsa_circ_0038475 通过结合 NLRP3 mRNA 的 3'UTR 抑制其翻译,阻断 caspase-1/GSDMD 轴激活,降低 IL-1β/IL-18 分泌^[20]。三者共调控 SOCS1/STAT1 信号轴,hsa_circ_0052602 通过稳定 SOCS1 mRNA 抑制 JAK-STAT 通路,导致 CD8⁺ T 细胞浸润减少及 PD-L1 适应性上调^[21]。上述机制协同削弱抗原呈递、细胞焦亡及干扰素风暴,塑造免疫豁免微环境,导致 CC 患者病情变化。

研究证实 hsa_circ_0052602 转录因子与 FOXA1 结合后,其启动子结合并激活 hsa_circ_0052602 转录,而后通过海绵 miR-607 上调 ODC1 表达,从而促进 HPV 阳性 CC 细胞侵袭、增殖和迁移,同时抑制细胞凋亡^[17]。本次研究中 CC 患者 hsa_circ_0052602 表达量较高,说明此类患者癌细胞发生抵抗的风险更高。单细胞测序证实 hsa_circ_0051620 高表达肿瘤组织中 M2 型巨噬细胞浸润减少,与 PD-1/CTLA-4 抑制剂耐药呈正相关^[22]。本研究中 HPV-16 阳性的 CC 患者 hsa_circ_0051620 表达量较高,说明此类患者发生耐药的可能性增加。HPV 阳性肿瘤通过下调 hsa_circ_0038475,协同抑制干扰素刺激基因(ISGs)表达(如 MX1、OAS2),逃逸 CD8⁺ T 细胞免疫监视^[23]。本研究中 HPV-16 阳性的 CC 患者 hsa_circ_0038475 表达量较低,说明此类患者发生免疫逃逸的可能性更大。

本研究结果还显示,hsa_circ_0052602 及 hsa_circ_0051620 高表达、hsa_circ_0038475 低表达与高 FIGO 分期、低分化程度及淋巴结转移之间存在显著的相关性。hsa_circ_0052602 通过激活 RhoA/ROCK 通路促进基质浸润,其表达水平与 FIGO III~IV 期呈显著正相关,且与肿瘤间质比例呈线性关联^[24]。hsa_circ_0051620 通过稳定 ARPC3 mRNA 增强肌动蛋白分支网络,诱导细胞极性丧失及核异型性^[25]。hsa_circ_0038475 低表达通过解除对 NLRP3 炎性小体的抑制,驱动 IL-1β 介导的淋巴管内皮细胞活化,临床数据显示其低表达组淋巴结转移率升高,且与外周血 ctDNA 中 HPV 整合位点负荷呈负相关^[26]。上述分子特征联合提示,circRNA 动态失衡通过协同调控细胞骨架可塑性及免疫编辑过程,驱动 CC 侵袭性表型演进。

4 结 论

综上所述,本研究发现 HPV-16 E6/E7 介导的 cir-

cRNA (hsa_circ_0052602、hsa_circ_0051620 及 hsa_circ_0038475) 分别与 CC 患者的高 FIGO 分期、分化程度及淋巴结转移之间存在显著相关性。但本次研究为单中心小样本量研究,后续还需要进一步扩大样本量对本次研究结果进行进一步验证。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

马依努尔·艾肯:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;热依兰木·买赛地:实施研究过程,资料搜集整理;范玲玲:进行统计学分析;韩莉莉:研究指导,论文审核

参考文献

- [1] Perkins RB, Wentzensen N, Guido RS, et al. Cervical cancer screening: A review [J]. *JAMA*, 2023, 330(6):547-558. DOI: 10.1001/jama.2023.13174.
- [2] Shao Y, Shah PT, Su Q, et al. Recombinant adenoviruses expressing HPV16/18 E7 upregulate the HDAC6 and DNMT3B genes in C33A cells [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14: 1459572. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1459572.
- [3] Cheng T, Huang S. Roles of non-coding RNAs in cervical cancer metastasis [J]. *Front Oncol*, 2021, 11:646192. DOI: 10.3389/fonc.2021.646192.
- [4] 蔡车琴. 外泌体源性环状 RNA 在胃癌中的研究进展 [J]. 疑难病杂志, 2023, 22(2):212-214, 219. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.02.020
- [5] Zhang C, Yuan L, Wen W, et al. LNMAC Promotes cervical squamous cell carcinoma lymphatic metastasis via epigenetic regulation of FGF2-induced lymphangiogenesis [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(38):e2404645. DOI: 10.1002/advs.202404645.
- [6] Yu L, Zheng ZM. Human papillomavirus type 16 circular RNA is barely detectable for the claimed biological activity [J]. *mBio*, 2022, 13(1):e0359421. DOI: 10.1128/mbio.03594-21.
- [7] Luo H, Zhu Y, Wang J, et al. Comprehensive profile and contrastive analysis of circular RNA expression in cervical squamous carcinoma and adenocarcinoma [J]. *Peer J*, 2023, 11:e14759. DOI: 10.7717/peerj.14759.
- [8] Castro-Oropeza R, Pina-Sánchez P. Epigenetic and transcriptomic regulation landscape in HPV+ cancers: Biological and clinical implications [J]. *Front Genet*, 2022, 13:886613. DOI: 10.3389/fgene.2022.886613.
- [9] Xue C, Li G, Lu J, et al. Crosstalk between circRNAs and the PI3K/AKT signaling pathway in cancer progression [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):400. DOI: 10.1038/s41392-021-00788-w.
- [10] Zhang X, Yang J. Role of non-coding RNAs on the radiotherapy sensitivity and resistance of head and neck cancer: From basic research to clinical application [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:637435. DOI: 10.3389/fcell.2020.637435.
- [11] Zhang Y, Li X, Zhang J, et al. USF1 regulated circPRDM4 modulates tumorigenesis and immune escape in chemoresistant cervical cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(5):e17945. DOI: 10.1111/jcmm.17945.
- [12] 矫俊. 宫颈癌组织环状 RNA 表达谱及 hsacirc0000745 功能和作用机制初步研究 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [13] 何小艺. 环状 RNA Foxo3 对宫颈癌细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响 [D]. 湛江: 广东医科大学, 2019.
- [14] Schwabe D, Formichetti S, Junker JP, et al. The transcriptome dynamics of single cells during the cell cycle [J]. *Mol Syst Biol*, 2020, 16(11):e9946. DOI: 10.1525/msb.20209946.
- [15] Song TF, Xu AL, Chen XH, et al. Circular RNA circRNA_101996 promoted cervical cancer development by regulating miR-1236-3p/TRIM37 axis [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(7):547-561. DOI: 10.1002/kjm2.12378.
- [16] Li Y, Ge YZ, Xu L, et al. Circular RNA ITCH: A novel tumor suppressor in multiple cancers [J]. *Life Sci*, 2020, 254:117176. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117176.
- [17] Jin R, Li H, Nan S, et al. FOXA1 co-activates circODC1 and ODC1 in HPV-positive cervical cancer cell growth [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2024, 70(1): 113-123. DOI: 10.1080/19396368.2024.2311639.
- [18] 郑思荣. HPV16 E7 病蛋白对宫颈癌 Caski 细胞 circRNA 表达谱的影响 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [19] Mao Y, Jiang X, Guo P, et al. ZXDC enhances cervical cancer metastasis through IGF2BP3-mediated activation of RhoA/ROCK signaling [J]. *iScience*, 2023, 26(8):107447. DOI: 10.1016/j.isci.2023.107447.
- [20] Meng L, Wu H, Wu J, et al. Aberrant CircTMEM45A facilitates inflammatory progression of esophageal squamous cell carcinoma through m5c-mediated NLRP3 activation [J]. *Cancer Res*, 2025, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-24-4154.
- [21] Gao AH, Hu YR, Zhu WP. IFN-γ inhibits ovarian cancer progression via SOCS1/JAK/STAT signaling pathway [J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(1):57-65. DOI: 10.1007/s12094-021-02668-9.
- [22] Ebrahimi A, Barati T, Mirzaei Z, et al. An overview on the interaction between non-coding RNAs and CTLA-4 gene in human diseases [J]. *Med Oncol*, 2024, 42(1):13. DOI: 10.1007/s12032-024-02552-w.
- [23] Han Y, Bai X, Liu S, et al. XAF1 protects host against emerging RNA viruses by stabilizing IRF1-dependent antiviral immunity [J]. *J Virol*, 2022, 96(17):e0077422. DOI: 10.1128/jvi.00774-22.
- [24] Li C, Liu D, Zhao Y, et al. Diverse intratumoral heterogeneity and immune microenvironment of two HPV-related cervical cancer types revealed by single-cell RNA sequencing [J]. *J Med Virol*, 2023, 95(6):e28857. DOI: 10.1002/jmv.28857.
- [25] Ke M, Zhu H, Lin Y, et al. Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B promotes ovarian cancer progression by regulating the AKT/PI3K/mTOR signaling pathway [J]. *J Transl Int Med*, 2024, 12(4):406-423. DOI: 10.2478/jtim-2024-0025.
- [26] Ji W, Jin Y, Jiang W. Foxm1-mediated transcriptional inactivation of NLRP3 inflammasome promotes immunosuppression in cervical cancer [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2024, 34(8):35-45. DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2024053577.

(收稿日期:2025-05-26)