

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.004

· 基础研究 ·

## 牙龈卟啉单胞菌通过 GARP 促进 TGF- $\beta$ /SMAD 轴介导食管鳞状细胞癌细胞的上皮间质转化

张升华<sup>1</sup>, 杨静怡<sup>1</sup>, 祁春晖<sup>1</sup>, 乔亮<sup>2</sup>, 高社干<sup>1</sup>, 齐义军<sup>1</sup> (1. 河南科技大学临床医学院, 河南科技大学第一附属医院, 肿瘤医院, 省部共建食管癌防治国家重点实验室, 河南省微生态与食管癌防治重点实验室, 河南省肿瘤表观遗传重点实验室, 河南 洛阳 471003; 2. 河南科技大学第一附属医院 病理科, 河南 洛阳 471003)

**[摘要]** **目的:** 阐明牙龈卟啉单胞菌(*Pg*)诱导食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞发生上皮间质转化(EMT)的分子机制。**方法:** KEGG 分析 *Pg* 诱导的 ESCC 差异表达基因富集的生物学通路, WB 和/或免疫荧光法检测 *Pg* 诱导的 ESCC 细胞中糖蛋白 A 重复优势蛋白(GARP)、TGF- $\beta$ 、pSMAD/SMAD、Snail、Oct4 和 EMT 相关分子表达的变化, ELISA 检测 TGF- $\beta$ 1 水平的变化, 免疫组织化学法检测 ESCC 组织中 GARP 和 TGF- $\beta$ 1 的表达规律, Transwell 实验和动物实验验证 *Pg* 对 ESCC 的促进作用。**结果:** ESCC 细胞感染 *Pg* 后, TGF- $\beta$ 、Hippo、PI3K/Akt 等信号通路被激活; *Pg* 感染刺激 ESCC 细胞分泌总 TGF- $\beta$ 1 和活性 TGF- $\beta$ 1 的水平升高(均  $P < 0.01$ ), 使 SMAD2/3 磷酸化并发生核转位, 诱导 N-cadherin、Snail、Oct4 等蛋白表达升高、E-cadherin 蛋白表达降低, 由此促进 ESCC 细胞的迁移、侵袭和裸鼠皮下移植瘤的生长(均  $P < 0.01$ )。在 ESCC 细胞中沉默 GARP 表达后, 逆转了 *Pg* 所诱导的上述 ESCC 细胞表型变化。*Pg* 丰度高的 ESCC 组织中 TGF- $\beta$ 1 和 GARP 蛋白表达高于低丰度的 ESCC 组织, 且 *Pg* 丰度与 TGF- $\beta$ 1、GARP 表达存在正向关联( $P = 0.0015$ )。**结论:** *Pg* 通过 GARP 激活 TGF- $\beta$ /SMAD 轴促进 ESCC 细胞发生 EMT, 进而促进 ESCC 细胞的迁移、侵袭和生长, 清除 *Pg* 或阻断 TGF- $\beta$  信号转导则可阻断上述 *Pg* 对 ESCC 的促进作用。

**[关键词]** 食管鳞状细胞癌; 牙龈卟啉单胞菌; 糖蛋白 A 重复优势蛋白; TGF- $\beta$ ; SMAD; 上皮间质转化

**[中图分类号]** R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)08-0769-08

## *Porphyromonas gingivalis* promotes epithelial-mesenchymal transition of esophageal squamous cell carcinoma cells mediated by TGF- $\beta$ /SMAD signaling via GARP

ZHANG Shenghua<sup>1</sup>, YANG Jingyi<sup>1</sup>, QI Chunhui<sup>1</sup>, QIAO Liang<sup>2</sup>, GAO Shegan<sup>1</sup>, QI Yijun<sup>1</sup> (1. State Key Laboratory of Esophageal Cancer Prevention & Treatment, Henan Key Laboratory of Microbiome and Esophageal Cancer Prevention and Treatment; Henan Key Laboratory of Cancer Epigenetics; Cancer Hospital, the First Affiliated Hospital, College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To elucidate the molecular mechanism by which *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells. **Methods:** KEGG was used to identify the biological pathways enriched by *Pg*-induced differentially expressed genes in ESCC. WB and/or immunofluorescence (IF) were used to detect the changes in the expression of glycoprotein-A repetitions predominant protein (GARP), TGF- $\beta$ , pSMAD/SMAD, Snail, Oct4 and EMT-related molecules in *Pg*-induced ESCC cells. ELISA was used to measure changes in TGF- $\beta$ 1 level. Immunohistochemistry was used to detect the expression of GARP and TGF- $\beta$ 1 in ESCC tissues. The tumorigenic effect of *Pg* on ESCC was verified by Transwell assays and animal experiments. **Results:** *Pg* activated multiple signaling pathways, such as TGF- $\beta$ , Hippo, and PI3K/Akt. *Pg*-infection stimulated an increased secretion of total TGF- $\beta$ 1 and active TGF- $\beta$ 1 in ESCC cells ( $P < 0.01$ ), leading to SMAD2/3 phosphorylation and nuclear translocation, which induced increased protein expression of N-cadherin, Snail, and Oct4 and decreased E-cadherin. These alterations collectively promoted the migration and invasion of ESCC cells and the growth of subcutaneous tumor in nude mice (all  $P < 0.01$ ). Silencing GARP expression in ESCC cells reversed the phenotypic changes induced by *Pg*. The protein levels of TGF- $\beta$ 1 and GARP in ESCC tissues with high *Pg* abundance were higher than those in ESCC tissues with low *Pg* abundance. The

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 81872037); 河南省医学科技攻关-省部共建重点项目(No. SBJ202002100)

**[作者简介]** 张升华(1989—), 男, 硕士生, 主要从事食管鳞癌的基础与临床研究。E-mail: zhangshenghua70@hotmail.com

**[通信作者]** 齐义军, E-mail: qiqiyijun@163.com

abundance of *Pg* was positively correlated with the protein expression of TGF- $\beta$ 1 and GARP ( $P=0.0015$ ). **Conclusion:** *Pg* activates the TGF- $\beta$ /Smad axis through GARP to promote the occurrence of EMT in ESCC cells, thereby facilitating the migration, invasion and growth of ESCC cells. *Pg* clearance or TGF- $\beta$  signaling blockade can reverse these *Pg*-induced promotive effects on ESCC.

**[Key words]** esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*); glycoprotein-A repetitions predominant protein (GARP); TGF- $\beta$ ; small mothers against decapentaplegic (SMAD); epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(8): 769-776. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.004]

虽然肿瘤起源于体细胞基因突变的逐步累积, 但肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)、免疫监视等外在因素也影响着肿瘤的发生、发展<sup>[1-2]</sup>。近年来, 应用高通量DNA测序技术和生物信息学方法在越来越多的肿瘤中鉴定出细菌、病毒等微生物, 这些TME中的细菌定植于肿瘤细胞、间质细胞、免疫细胞等细胞内部, 参与肿瘤发生、转移、肿瘤免疫、化疗耐药等过程<sup>[3-4]</sup>。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *Pg*)是革兰氏阴性的口腔厌氧菌, 不仅是牙周炎的关键致病菌, 还与多种肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[5]</sup>。人食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中定植的*Pg*丰度高于癌旁组织, 并且与ESCC淋巴结转移、侵袭、转移和化疗耐药相关<sup>[6]</sup>。本研究探讨了*Pg*感染的ESCC细胞和组织中TGF- $\beta$ /SMAD (small mothers against decapentaplegic)信号轴、上皮间质转化(EMT)等相关分子变化, 揭示*Pg*促进ESCC进展的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

RPMI 1640和胎牛血清(货号164210)购自武汉普诺赛公司, 脑心浸液培养液(货号B8130)购自北京索莱宝公司, RIPA裂解液(货号CW2333S)和BCA蛋白定量试剂盒(货号CW0014S)均购自江苏康为世纪公司, PAGE凝胶快速制备试剂盒(货号PG113)购自上海雅酶公司, PVDF膜(货号IPVH00010)购自美国Merck公司, Oct4兔一抗(货号11263-1-AP)和超敏ECL化学发光检测试剂盒(货号PK10003)均购自美国Proteintech公司, pSMAD2/3兔一抗(货号8828)、SMAD2/3兔一抗(货号8685)、E-cadherin鼠一抗(货号14472)、N-cadherin鼠一抗(货号14215)、GAPDH兔一抗(货号5174)、Snail兔一抗(货号3879)、HRP标记兔二抗(货号7074S)和鼠二抗(货号7076S)均购自美国CST公司, 糖蛋白A重复优势蛋白(glycoprotein-A repetitions predominant protein, GARP)兔一抗(货号GTX81794)购自美国GeneTex公司, TGF- $\beta$ 1鼠一抗(货号64715)购自英国Abcam公司, TGF- $\beta$ 受体激酶抑制剂SB-431542(货号HY-10431)购自美国MedChem Express公司, 替硝唑(货号E823310)购自上海麦克林公司, 总TGF- $\beta$ 1预包被ELISA试剂盒

(货号436707)和游离活性TGF- $\beta$ 1预包被ELISA试剂盒(货号437707)均购自美国BioLegend公司, Transwell迁移小室(货号3422)和Transwell浸润小室(货号354480)均购自美国Corning公司, siRNA均购自上海吉玛公司, 免疫组织化学(IHC)染色采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法, DAB(货号DA1010)购自北京索莱宝公司。凝胶成像系统购自Bio-Rad公司。

### 1.2 细胞株、菌株和组织来源

雄性BALB/c无胸腺裸鼠(4周龄)购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于无菌动物笼, 给予SPF饲料、灭菌水饲养, 本项目得到河南科技大学第一附属医院医学伦理委员会的批准, 审批号为2022-03-B111。实验动物合格证号: 202111350。

野生型*Pg* ATCC33277来自ATCC细胞库, NE6-T细胞和KYSE30细胞来自河南科技大学第一附属医院肿瘤表观遗传重点实验室。190例ESCC样本来自河南科技大学第一附属医院和安阳肿瘤医院2012年3月到2017年3月手术切除的ESCC及癌旁组织(距离癌灶边缘3 cm)。所有ESCC患者术前均未接受放化疗, 术后切除样本经病理学证实为ESCC。本项目得到河南科技大学第一附属医院医学伦理委员会的批准, 审批号为2022-03-B110。

### 1.3 *Pg*和ESCC细胞培养

NE6-T细胞和KYSE30细胞复苏后用含10% FBS的RPMI 1640培养液于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养, 细胞生长至80%~90%汇合时传代, 取对数生长期细胞进行后续实验。用含酵母提取物(1 mg/mL)、高铁血红素(5  $\mu$ g/mL)、维生素K3-D3(1  $\mu$ g/mL)的胰蛋白酶大豆肉汤培养液培养*Pg*, 厌氧箱设置参数为含5% CO<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、85% N<sub>2</sub>和37 °C。取对数生长期*Pg*于13 313 $\times$ g、4 °C离心5 min, 去除上清液, 菌体用PBS重悬后以MOI=20感染ESCC细胞。用DMSO配制SB-431542和替硝唑, 储存质量浓度分别为1 mg/mL、50 mg/mL, 使用时用PBS稀释1 000倍后用于细胞实验。对照组ESCC细胞接受相应量的DMSO和/或PBS处理, *Pg*感染ESCC细胞的MOI为20, TGF- $\beta$ 1抗体中和和质量浓度为1  $\mu$ g/mL。

#### 1.3.1 ELISA检测总TGF- $\beta$ 1和活性TGF- $\beta$ 1的表达

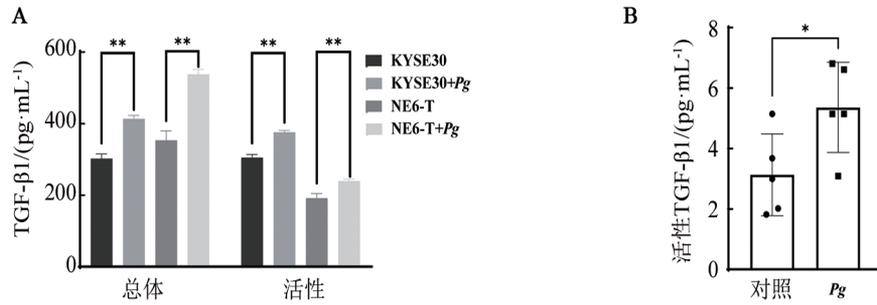
收集不同处理组细胞培养上清液, 提取皮下荷



### 2.2 *Pg* 刺激 ESCC 细胞分泌并激活 TGF-β1

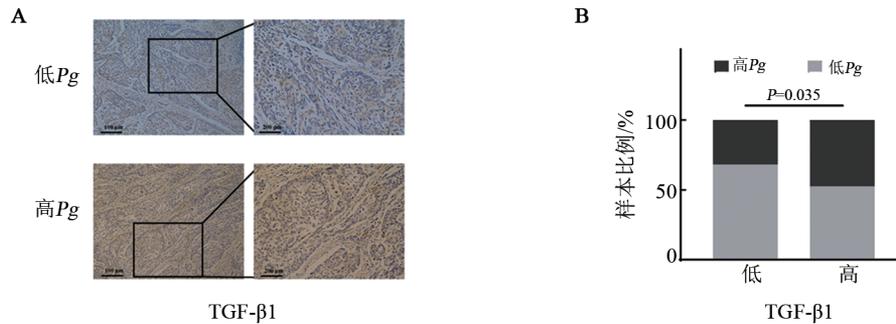
*Pg* 感染的 NE6-T 细胞和 KYSE30 细胞培养上清液中总 TGF-β1 和活性 TGF-β1 水平显著高于未感染的对照组细胞 (均  $P < 0.01$ ); 同样, *Pg* 感染的 NE6-T 细胞来源的皮下荷瘤组织中活性 TGF-β1 水平明显高于 *Pg* 未感染的荷瘤组织 ( $P < 0.05$ )。应用 IHC 法检测

190 例 ESCC 组织中 TGF-β1 表达发现, *Pg* 感染的 ESCC 中的 TGF-β1 阳性率 (47.5%, 38/80) 显著高于 *Pg* 阴性的 ESCC 组织 (31.8%, 35/110;  $P = 0.035$ )。上述结果表明, *Pg* 感染刺激 ESCC 细胞分泌 TGF-β1 的能力增强, 并能够使活性 TGF-β1 增加。见图 2 和图 3。



A: *Pg* 感染和未感染对 NE6-T 和 KYSE30 细胞培养上清液中总 TGF-β1 及活性 TGF-β1 蛋白表达的影响; B: *Pg* 感染和未感染皮下荷瘤组织中活性 TGF-β1 蛋白的表达水平。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 2 ELISA 检测总 TGF-β1 和活性 TGF-β1 蛋白表达



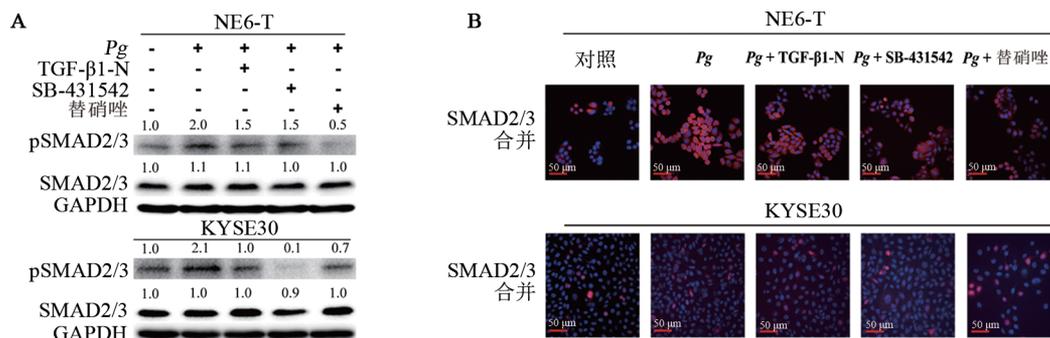
A: *Pg* 低丰度和高丰度 ESCC 组织中 TGF-β1 蛋白表达; B: *Pg* 低丰度和高丰度 ESCC 组织中 TGF-β1 的表达。

图 3 免疫组织化学法检测 ESCC 组织中 TGF-β1 蛋白表达

### 2.3 *Pg* 通过 TGF-β/SMAD 信号通路促进 ESCC 细胞发生 EMT

*Pg* 感染 NE6-T 细胞和 KYSE30 细胞 24 h 后, WB 法检测到 SMAD2/3 磷酸化明显增加; *Pg* 感染前 4 h 加入替硝唑, 能够抑制 pSMAD2/3 表达增加; *Pg*

感染前 4 h 给予 TGF-β1-N 或 TGF-βRI 激酶抑制剂 SB-431542, 同样也抑制了 pSMAD2/3 表达增加。另外, 免疫荧光结果证实, *Pg* 感染能够诱导 SMAD2/3 在 NE6-T 细胞和 KYSE30 细胞核内表达明显增加。见图 4。

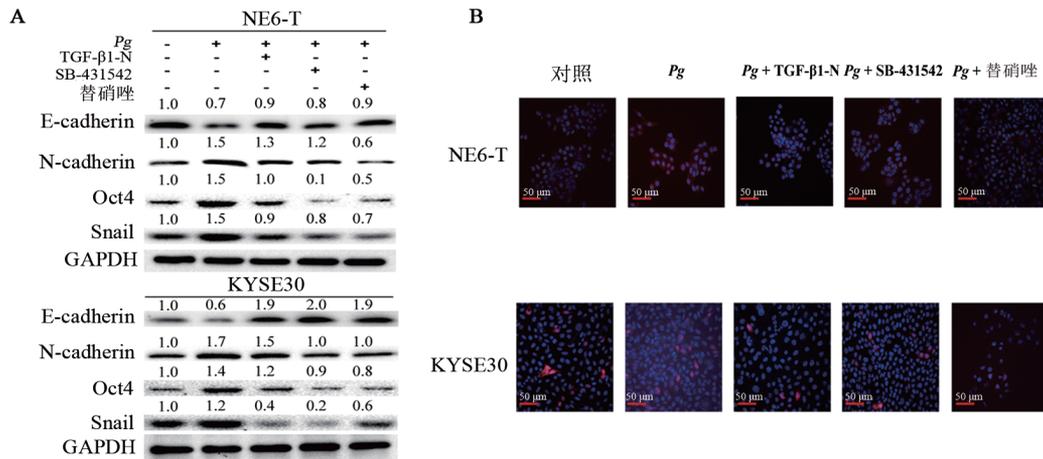


A: WB 法检测不同处理组细胞中 SMAD2/3 及磷酸化 SMAD2/3 蛋白表达; B: 免疫荧光法检测不同处理组细胞中 SMAD2/3 蛋白表达及分布。

图 4 *Pg* 激活 TGF-β/SMAD 信号通路

WB 法检测结果(图 5A)表明, *Pg* 感染能够降低 E-cadherin 蛋白表达, 同时增加 N-cadherin、Snail、Oct4 等蛋白表达; 免疫荧光检测结果(图 5B)也表明,

*Pg* 感染后, NE6-T 细胞和 KYSE30 细胞核中 Oct4 蛋白表达也有所增加; 替硝唑、TGF-β1-N 和 SB-431542 的预处理逆转了 *Pg* 对上述分子的调控作用。



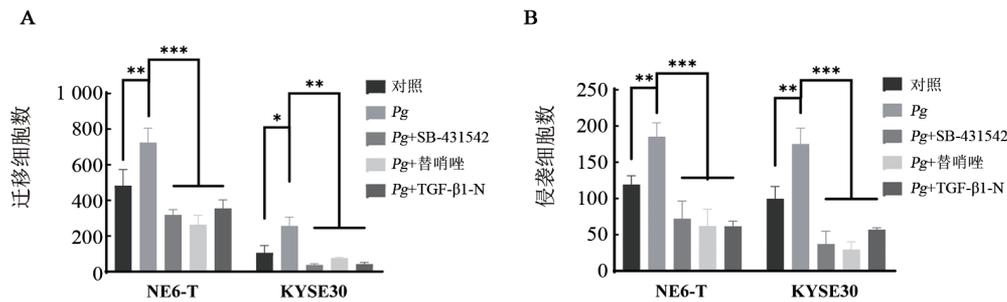
A: WB 法检测不同处理组细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Oct4 和 Snail 蛋白表达; B: 免疫荧光检测不同处理组细胞中 Oct4 蛋白表达。

图 5 *Pg* 通过激活 TGF-β1 诱导 ESCC 细胞发生 EMT

#### 2.4 *Pg* 通过 TGF-β/SMAD 信号通路促进 ESCC 进展

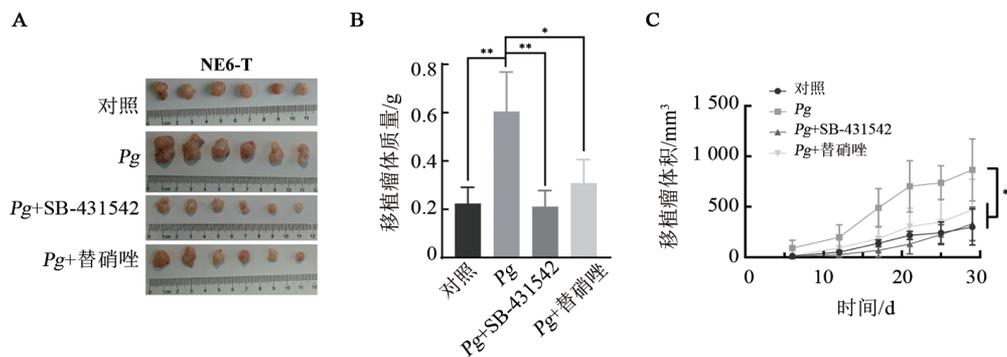
Transwell 小室实验结果(图 6)表明, SB-431542 预处理能够阻断 *Pg* 诱导的 NE6-T 细胞和 KYSE30 细胞的迁移和侵袭能力增加(均  $P < 0.01$ )。裸鼠皮下移植瘤实验结果(图 7)表明, *Pg* 感染明显促进了 NE6-T 细胞在裸鼠皮下生长( $P < 0.01$ ), *Pg* 感染的 NE6-T 细

胞来源的皮下移植瘤体积和质量显著高于对照组未感染细胞( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), SB-431542 处理阻断了 *Pg* 对 NE6-T 皮下移植瘤生长的促进作用( $P < 0.01$ )。上述实验结果表明, TGF-β/SMAD 信号通路介导了 *Pg* 对 ESCC 的促进作用。



A: Transwell 小室检测不同处理组细胞迁移; B: Transwell 小室检测不同处理组细胞侵袭。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 6 *Pg* 通过 TGF-β1 促进 ESCC 细胞的迁移和侵袭



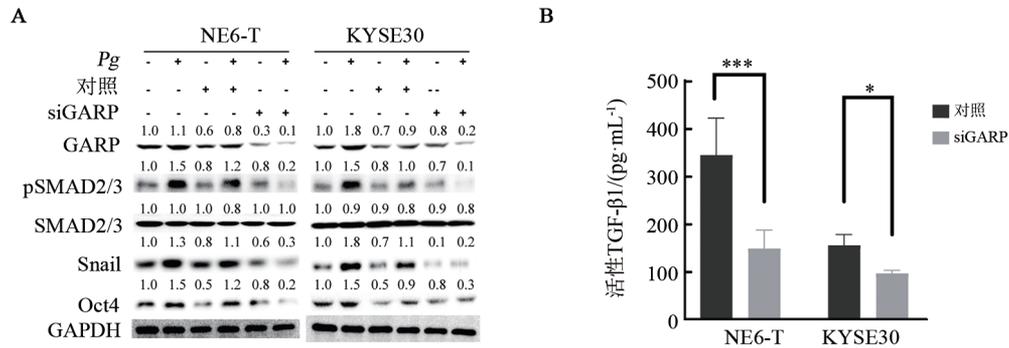
A: 各组裸鼠皮下移植瘤; B: 各组裸鼠皮下移植瘤质量; C: 各组裸鼠移植瘤体积变化。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 7 *Pg* 通过 TGF-β1 促进 NE6-T 裸鼠皮下移植瘤的生长

### 2.5 Pg通过GARP激活TGF-β/SMAD信号通路

NE6-T细胞和KYSE30细胞感染Pg 24 h后, GARP表达明显上调;应用siRNA特异性沉默GARP表达后,NE6-T细胞和KYSE30细胞培养上清液中活

性TGF-β1显著减少(均 $P<0.05$ ),并且明显抑制了SMAD2/3的磷酸化、降低了Snail和Oct4的表达,见图8。

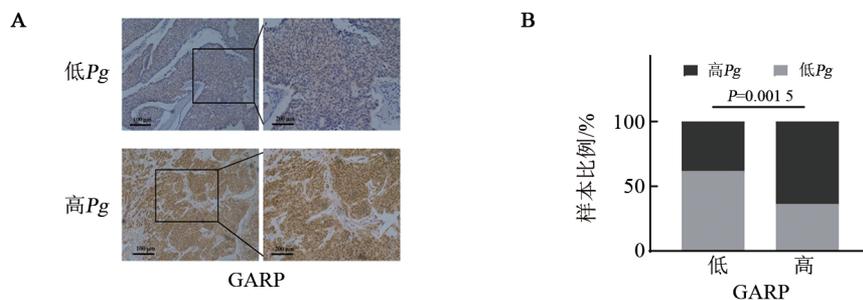


A: WB法检测不同处理组细胞中GARP、pSMAD2/3、SMAD2/3、Snail和Oct4蛋白的表达;B:ELISA试剂盒检测不同处理组细胞培养上清液中活性TGF-β1蛋白的表达。\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

图8 Pg通过上调GARP激活TGF-β/SMAD信号通路

应用IHC法检测190例ESCC组织中的GARP蛋白表达并分析GARP与Pg的相关性,发现80例Pg感染的ESCC组织中GARP高表达率、低表达率分别为63.7%(51/80)、36.3%(29/80),110例未感染ESCC组织中GARP高表达率、低表达率分别为38.2%

(42/110)、61.8%(68/110),卡方分析结果显示,ESCC中Pg感染与GARP蛋白表达存在正向关联( $P=0.0015$ ),见图9。上述结果表明,GARP参与了Pg激活TGF-β过程,进而激活TGF-β/SMAD信号通路。



A:Pg低丰度和高丰度ESCC组织中GARP蛋白表达;B:Pg低丰度和高丰度ESCC组织中GARP表达的相关性。

图9 免疫组织化学法检测ESCC组织中GARP蛋白表达

### 3 讨论

食管连接口腔与胃,因此,定植于食管黏膜的微生物来源于口腔或胃食管反流,包括厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌(Actinobacteria)、变形菌(Proteobacteria)、梭杆菌(Fusobacteria)、糖细菌(TM7)等6个门类和41个属的细菌,其中,39%为链球菌(Streptococcus)、17%为普氏菌(Prevotella)、14%为韦荣氏球菌属(Veilonella)<sup>[7]</sup>。正常食管组织中未检测到Pg,但61%(61/100)的ESCC组织中存在Pg,远高于癌旁组织的Pg阳性率(12%,12/100),ESCC组织中Pg丰度与肿

瘤低分化、淋巴结转移、TNM分期呈正相关<sup>[8]</sup>。85例接受新辅助化疗的ESCC患者中,66.7%(30/45)Pg阴性病例达到完全或部分缓解,明显高于Pg阳性ESCC患者(40.0%,16/40)。Pg感染的KYSE30细胞和KYSE70细胞增殖加快,Pg还能够诱导ESCC细胞对紫杉醇产生耐药,抗凋亡能力增加<sup>[6]</sup>。上述结果表明,Pg促进了ESCC恶性演进过程。

TME是一个异质的、结构化、动态的生态系统,为肿瘤细胞的生长提供了必要的支持和营养,在肿瘤演进过程中发挥肿瘤促进或抑制作用<sup>[1-2]</sup>。不仅如此,TME还是细菌、病毒等微生物生长的优势微环境,近年来的高通量测序技术在越来越多的肿瘤中

发现了细菌存在的分子依据<sup>[3,9]</sup>。TME 中的大多数细菌定植于肿瘤细胞、免疫细胞等细胞内部,通过改变基因表达模式、基因组不稳定性、异常代谢产物、炎症和免疫反应、劫持信号通路等多种途径,参与肿瘤转移、肿瘤免疫监视、化疗耐药、肿瘤免疫治疗反应等肿瘤演进过程<sup>[10-11]</sup>。

TGF- $\beta$  是一种机体内广泛存在的多功能细胞因子,能够调节细胞生长、分化、迁移等多种生理学过程,参与胚胎发育和成年各组织稳态维持<sup>[12-15]</sup>。正常生理条件下,TGF- $\beta$  不仅通过诱导 p15、p21、p57 等蛋白表达引起细胞周期阻滞,还能够通过 BIM、DAPK 等诱导特定细胞凋亡,从而维持基因组稳定性,发挥抑癌作用<sup>[16]</sup>。因此,由 TGFBR1、TGFBR2、SMAD2、SMAD3、SMAD4 等基因突变或杂合性缺失造成的 TGF- $\beta$  通路失活见于多种肿瘤,参与肿瘤发生,并与预后密切相关<sup>[17-19]</sup>。

哺乳动物中,TGF- $\beta$  亚家族包含三个异构体:TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3。这三个异构体具有较高的结构和序列相似度,序列相似度达 68%,但在不同的生理、病理状态下,TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3 发挥不同的生理功能,TGF- $\beta$ 1 广泛表达于多种人类肿瘤<sup>[18,20]</sup>。机体细胞合成的 TGF- $\beta$  是非活性的前体蛋白质分子,包含 N 端非活性相关肽、C 端活性 TGF- $\beta$ ,被内切酶 Furin 裂解后,通过二硫键形成非活性的同源二聚体被分泌至细胞外基质中,再与各种锚定蛋白结合,通过这些锚定蛋白调控 TGF- $\beta$  的组织分布和活性<sup>[21-23]</sup>。机体内非活性的 TGF- $\beta$  激活方式有多种,如热或酸性微环境、多种蛋白酶、凝血酶致敏蛋白-1、物理切应力等<sup>[24-25]</sup>。Treg 细胞表面穿膜糖蛋白 GARP 作为锚定蛋白,与 TGF- $\beta$  具有超高亲和力,能够与整合素  $\alpha$ V $\beta$ 6 或  $\alpha$ V $\beta$ 8 的 RGD 基序协同作用,释放出活性 TGF- $\beta$ <sup>[22]</sup>。本研究证实,*Pg* 能够上调 ESCC 细胞表面的 GARP,介导 TGF- $\beta$ 1 激活,ESCC 中 *Pg* 感染与 GARP 呈正相关,提示 GARP 是阻断 TGF- $\beta$  活性及下游信号激活的潜在靶点分子。

活性的 TGF- $\beta$  与 II 型 TGF- $\beta$  受体(TGF- $\beta$ R II)同源二聚体胞外结构域结合形成复合体,然后结合并反式激活 I 型 TGF- $\beta$  受体(TGF- $\beta$ R I),肿瘤中最常见的 TGF- $\beta$ R I 是具有丝氨酸苏氨酸激酶活性的 ALK5(activin-like kinase 5)。激活的 ALK5 使 R-SMAD 家族的 SMAD2 和 SMAD3 发生磷酸化,与 SMAD4 形成异源三聚体入核,与其他转录因子协同调控基因表达,引发生物学效应<sup>[18,26]</sup>。本研究证实,ESCC 细胞感染 *Pg* 后,磷酸化 SMAD2/3 升高,TGF- $\beta$ 1 中和抗体和 ALK 抑制剂 SB-431542 特异性的阻断了 *Pg* 诱导的 SMAD2/3 磷酸化、EMT 和肿瘤干性富集,抑制 ESCC

细胞的迁移、侵袭和裸鼠皮下移植瘤的生长,表明 *Pg* 通过 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路促进了 ESCC 进展。

本研究证实了 *Pg* 感染 ESCC 细胞和 ESCC 组织 GARP 表达上调,激活 SMAD 依赖的 TGF- $\beta$  信号通路,促进 EMT、诱导干性分子 Oct-4 表达上调,增加 ESCC 迁移、侵袭和生长,阻断 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路抑制了 *Pg* 对 ESCC 的促进作用,为 *Pg* 感染的 ESCC 临床治疗提供了潜在的治疗靶点。

**利益冲突声明:**所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参考文献]

- [1] THORSSON V, GIBBS D L, BROWN S D, *et al.* The immune landscape of cancer[J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 812-830. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.023.
- [2] BAGAEV A, KOTLOV N, NOMIE K, *et al.* Conserved pan-cancer microenvironment subtypes predict response to immunotherapy[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(6): 845-865. DOI: 10.1016/j.ccell.2021.04.014.
- [3] NEJMAN D, LIVYATAN I, FUKS G, *et al.* The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria [J]. *Science*, 2020, 368(6494): 973-980. DOI: 10.1126/science.aay9189.
- [4] GALEANO NIÑO J L, WU H R, LACOURSE K D, *et al.* Effect of the intratumoral microbiota on spatial and cellular heterogeneity in cancer[J]. *Nature*, 2022, 611(7937): 810-817. DOI: 10.1038/s41586-022-05435-0.
- [5] REYES L. *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Trends Microbiol*, 2021, 29(4): 376-377. DOI: 10.1016/j.tim.2021.01.010.
- [6] GAO S G, LIU Y W, DUAN X X, *et al.* *Porphyromonas gingivalis* infection exacerbates oesophageal cancer and promotes resistance to neoadjuvant chemotherapy[J]. *Br J Cancer*, 2021, 125(3): 433-444. DOI: 10.1038/s41416-021-01419-5.
- [7] PEI Z H, BINI E J, YANG L Y, *et al.* Bacterial biota in the human distal esophagus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(12): 4250-4255. DOI: 10.1073/pnas.0306398101.
- [8] GAO S G, LI S G, MA Z K, *et al.* Presence of *Porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer[J/OL]. *Infect Agent Cancer*, 2016, 11: 3[2024-02-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4717526/>. DOI: 10.1186/s13027-016-0049-x.
- [9] POORE G D, KOPYLOVA E, ZHU Q Y, *et al.* Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach[J]. *Nature*, 2020, 579(7800): 567-574. DOI: 10.1038/s41586-020-2095-1.
- [10] HELMINK B A, KHAN M A W, HERMANN A, *et al.* The microbiome, cancer, and cancer therapy[J]. *Nat Med*, 2019, 25(3): 377-388. DOI: 10.1038/s41591-019-0377-7.
- [11] LI Y Q, RAO G H, ZHU G N, *et al.* Dysbiosis of lower respiratory tract microbiome are associated with proinflammatory states in non-small cell lung cancer patients[J]. *Thorac Cancer*, 2024, 15(2): 111-121. DOI: 10.1111/1759-7714.15166.
- [12] 李坤, 王文英. 柚皮素基于 TGF- $\beta$ 2 介导对白内障晶状体病理性上皮间质转化的作用研究[J]. *中国中医眼科杂志*, 2023, 33(12): 1101-1108. DOI: 10.13444/j.cnki.zgzyyjkz.2023.12.001.
- [13] SIEGEL P M, MASSAGUÉ J. Cytostatic and apoptotic actions of

- TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 807-820. DOI: 10.1038/nrc1208.
- [14] MASSAGUÉ J, SHEPPARD D. TGF- $\beta$  signaling in health and disease [J]. *Cell*, 2023, 186(19): 4007-403. DOI: 10.1016/j.cell.2023.07.036.
- [15] TOMINAGA K, SUZUKI H I. TGF- $\beta$  signaling in cellular senescence and aging-related pathology[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5002 [2024-02-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31658594/>. DOI: 10.3390/ijms20205002.
- [16] MOUSTAKAS A, PARDALI K, GAAL A, *et al.* Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling in regulation of cell growth and differentiation[J]. *Immunol Lett*, 2002, 82(1/2): 85-91. DOI: 10.1016/S0165-2478(02)00023-8.
- [17] LEVY L, HILL C S. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(1/2): 41-58. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.09.009.
- [18] BIERIE B, MOSES H L. TGF-beta and cancer[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(1/2): 29-40. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.09.006.
- [19] 夏添明, 李朝辉, 王云帅, 等. miR-1273g-3p 调控 TGF- $\beta$ /SMAD4 信号通路影响结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. *实用肿瘤杂志*, 2024, 10(3): 219-227. DOI: 10.13267/j.cnki.shyzz.2024.034.
- [20] 王延朋, 王启船, 柳云飞, 等. FBI-1 通过 TGF- $\beta$ 1/SMADs 通路对肺腺癌细胞迁移、侵袭及 EMT 转化的机制研究[J]. *实用癌症杂志*, 2023, 9(11): 1769-1772.
- [21] KHALIL N. TGF-beta: from latent to active[J]. *Microbes Infect*, 1999, 1(15): 1255-1263. DOI: 10.1016/s1286-4579(99)00259-2.
- [22] WANG R, ZHU J H, DONG X C, *et al.* GARP regulates the bioavailability and activation of TGF $\beta$ [J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(6): 1129-1139. DOI: 10.1091/mbc.E11-12-1018.
- [23] DUAN Z L, LIN X Z, WANG L X, *et al.* Specificity of TGF- $\beta$ 1 signal designated by LRR33 and integrin  $\alpha$ V $\beta$ 8[J/OL]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4988[2024-02-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36008481/>. DOI: 10.1038/s41467-022-32655-9.
- [24] SHI M L, ZHU J H, WANG R, *et al.* Latent TGF- $\beta$  structure and activation[J]. *Nature*, 2011, 474(7351): 343-349. DOI: 10.1038/nature10152.
- [25] 任俊宇, 周锐泽, 雷梓, 等. 外泌体介导的 miR-663a 通过调控 TGF- $\beta$ 1/SMAD 信号通路影响结肠癌细胞侵袭和迁移[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(17): 4313-4317. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.17.057.
- [26] SHI Y G, MASSAGUÉ J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus[J]. *Cell*, 2003, 113(6): 685-700. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00432-x.

[收稿日期] 2024-02-27

[修回日期] 2024-06-16

[本文编辑] 黄静怡