

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- β /SMAD 轴介导食管鳞状细胞癌细胞的上皮间质转化

张升华¹, 杨静怡¹, 祁春晖¹, 乔亮², 高社干¹, 齐义军¹ (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- β 、pSMAD/SMAD、Snail、Oct4 和 EMT 相关分子表达的变化, ELISA 检测 TGF- β 1 水平的变化, 免疫组织化学法检测 ESCC 组织中 GARP 和 TGF- β 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- β 、Hippo、PI3K/Akt 等信号通路被激活; *Pg* 感染刺激 ESCC 细胞分泌总 TGF- β 1 和活性 TGF- β 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- β 1 和 GARP 蛋白表达高于低丰度的 ESCC 组织, 且 *Pg* 丰度与 TGF- β 1、GARP 表达存在正向关联($P = 0.0015$)。**结论:** *Pg* 通过 GARP 激活 TGF- β /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- β 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- β ; 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- β /SMAD signaling via GARP

ZHANG Shenghua¹, YANG Jingyi¹, QI Chunhui¹, QIAO Liang², GAO Shegan¹, QI Yijun¹ (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- β , pSMAD/SMAD, Snail, Oct4 and EMT-related molecules in *Pg*-induced ESCC cells. ELISA was used to measure changes in TGF- β 1 level. Immunohistochemistry was used to detect the expression of GARP and TGF- β 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- β , Hippo, and PI3K/Akt. *Pg*-infection stimulated an increased secretion of total TGF- β 1 and active TGF- β 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- β 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- β 1 and GARP ($P=0.0015$). **Conclusion:** *Pg* activates the TGF- β /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- β 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- β ; 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^[1-2]。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^[3-4]。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^[5]。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^[6]。本研究探讨了*Pg*感染的ESCC细胞和组织中TGF- β /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- β 1鼠一抗(货号64715)购自英国Abcam公司, TGF- β 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- β 1预包被ELISA试剂盒

(货号436707)和游离活性TGF- β 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% CO₂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 μ g/mL)、维生素K3-D3(1 μ 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% CO₂、10% H₂、85% N₂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- β 1抗体中和和质量浓度为1 μ g/mL。

1.3.1 ELISA检测总TGF- β 1和活性TGF- β 1的表达

收集不同处理组细胞培养上清液, 提取皮下荷

瘤组织蛋白,根据 TGF- β 1 ELISA 试剂盒说明书检测总 TGF- β 1 和活性 TGF- β 1 的质量浓度。

1.3.2 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力

各组细胞分别接受不同处理后,将 0.75×10^5 和 1×10^5 个细胞重悬于 250 μ L 无血清培养液中,分别接种于未包被 Matrigel (迁移实验) 和包被 Matrigel 的 Transwell 小室 (侵袭实验) 中,小室下层加入 500 μ L 含 10% 血清培养液,分别于 24 和 36 h 终止实验,4% 多聚甲醛固定、结晶紫染色后,棉签擦除小室内部细胞,显微镜下拍照并计数细胞数,进行统计分析。

1.4 WB 法检测 ESCC 细胞中相关蛋白的表达

收集不同处理组细胞, RIPA 裂解缓冲液裂解细胞、提取蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度。SDS-PAGE 分离蛋白、电转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 分别加入抗 pSMAD2/3 (1:200)、SMAD2/3 (1:500)、GARP (1:100)、E-cadherin (1:200)、N-cadherin (1:500)、Snail (1:200)、Oct4 (1:400)、GAPDH (1:1000) 一抗和相应二抗, ECL 曝光, 使用凝胶成像系统检测目的蛋白条带。以 GAPDH 为内参, 使用 Image J 软件量化蛋白条带的灰度值。

1.5 免疫荧光法检测 ESCC 细胞中 SMAD2/3 和 Oct4 的表达

收集不同处理组细胞, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.1% Triton X-100 通透 20 min, 2% BSA 封闭 1 h, 分别加入抗 SMAD2/3 (1:200)、Oct4 (1:200) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 复温 1 h 后加入相应二抗避光温育 1 h, DAPI 染色, 置于蔡司 LSM800 共聚焦显微镜下观察、拍照。

1.6 免疫组织化学法检测 ESCC 组织中 TGF- β 1 和 GARP 的表达

应用免疫组织化学 PV-9000 试剂盒检测 190 例 ESCC 组织中 TGF- β 1 和 GARP 的表达。组织切片经脱蜡、水化, EDTA 抗原修复, 过氧化氢和非免疫兔血清封闭非特异性反应, 加入兔抗 TGF- β 1 (1:500)、

GARP (1:250) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 下处理过夜, 加入抗兔二抗处理 1 h, DAB 显色。免疫组织化学评分根据切片中胞质着色的阳性细胞数和着色强度进行综合评分, 进行免疫染色的半定量分析。

1.7 裸鼠成瘤实验检测 Pg 感染对 NET-6 细胞移植瘤生长的影响

4~6 周龄 BALB/c 雄性裸鼠, 饲养于无菌动物笼中, 适应 2 周后, 自由饮食水, 于每只鼠右侧腋下皮下接种 3×10^6 个 Pg 感染或未感染的 NE6-T 细胞, 待皮下荷瘤长至 80~100 mm³ 后, 分为生理盐水 (100 μ L) 对照组、Pg 感染组、Pg 感染+SB-431542 处理 (0.5 mg/kg, 每周 2 次, 腹腔注射) 组、Pg 感染+替硝唑处理 (15 mg/kg, 每周 2 次, 腹腔注射) 组, 每组 6 只, 接受相应处理至第 4 周实验终止。实验过程中测量肿瘤大小, 实验终止时, 异氟烷麻醉后用颈椎脱臼法处死小鼠, 剥离瘤体称质量。

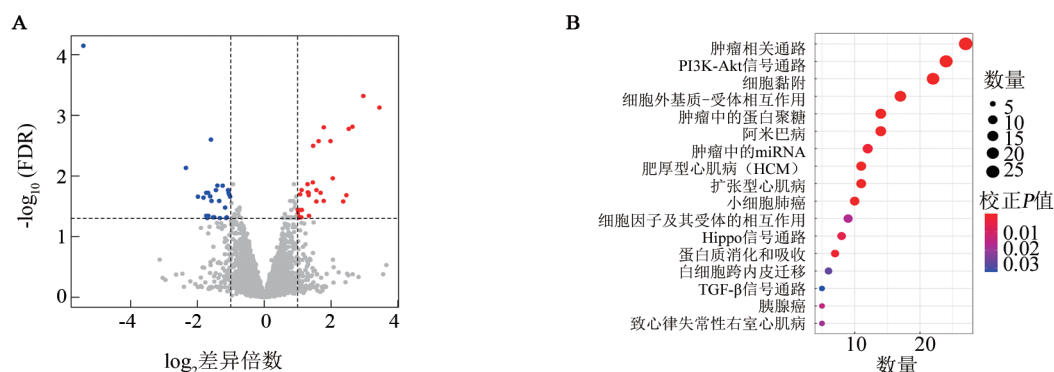
1.8 统计学处理

统计学分析均采用 SPSS 26.0 统计学软件分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用 *t* 检测或单因素方差分析; 计数资料以百分率表示, 免疫组织化学结果统计分析采用卡方检验或 Fisher 精确检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Pg 诱导 ESCC 细胞 mRNA 转录组及生物学通路变化

Pg 感染 KYSE30 细胞 24 h 后, 分别鉴定到 124 个表达上调基因和 121 个表达下调基因 (差异倍数 ≥ 1.5 倍)。应用 KEGG 富集分析发现, Pg 感染 ESCC 细胞后激活了 TGF- β 、Hippo、PI3K/Akt 等信号通路, 并引起细胞收缩、细胞黏附、细胞迁移、细胞因子介导的细胞间相互作用等多个生物学通路的改变, 提示 Pg 促进 ESCC 进展是一个多分子、多生物学通路的参与的复杂过程。见图 1。



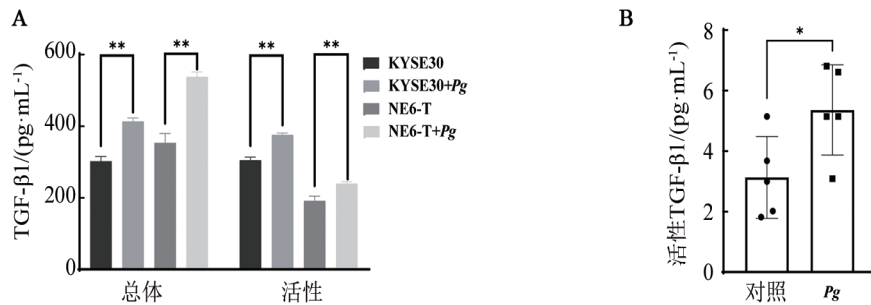
A: Pg 感染 ESCC 细胞后上调和下调的基因; B: Pg 诱导的差异表达基因参与的生物学通路的 KEGG 富集分析。

图 1 Pg 感染诱导的 ESCC 细胞差异表达基因

2.2 *Pg* 刺激 ESCC 细胞分泌并激活 TGF-β1

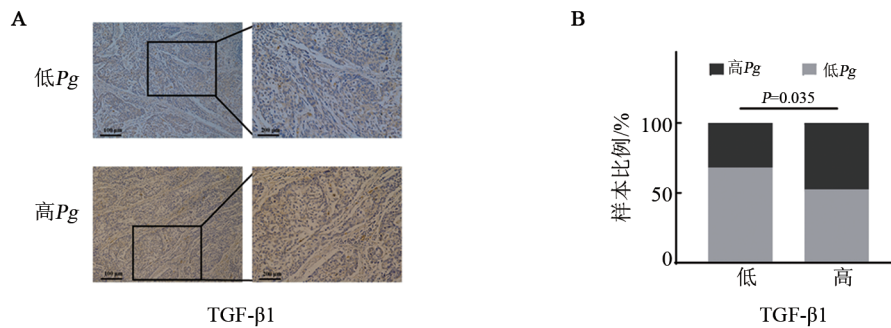
Pg 感染的 NE6-T 细胞和 KYSE30 细胞培养上清液中总 TGF-β1 和活性 TGF-β1 水平显著高于未感染的对照组细胞 (均 $P < 0.01$); 同样, *Pg* 感染的 NE6-T 细胞来源的皮下荷瘤组织中活性 TGF-β1 水平明显高于 *Pg* 未感染的荷瘤组织 ($P < 0.05$)。应用 IHC 法检测

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



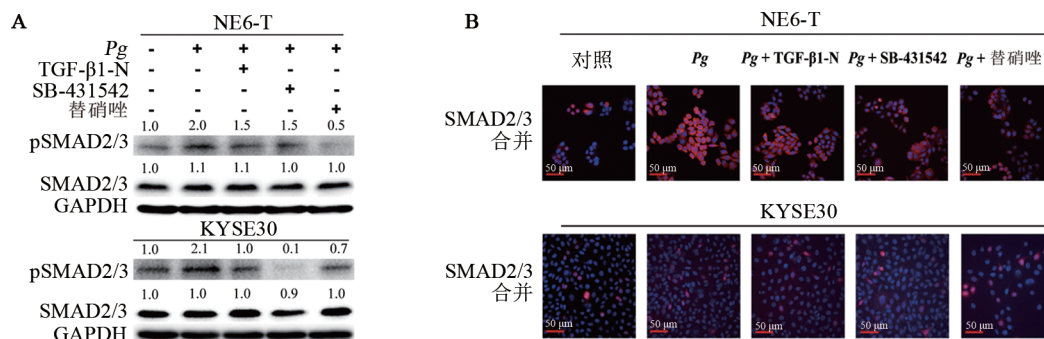
A: *Pg* 低丰度和高丰度 ESCC 组织中 TGF-β1 蛋白表达; B: *Pg* 低丰度和高丰度 ESCC 组织中 TGF-β1 的表达。

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。

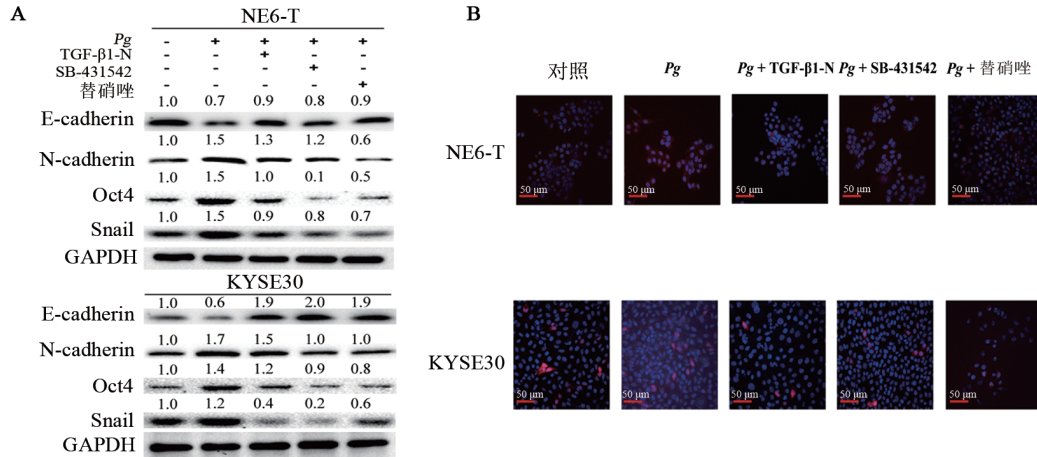


A: WB 法检测不同处理组细胞中 SMAD2/3 及磷酸化 SMAD2/3 蛋白表达; B: 免疫荧光法检测不同处理组细胞中 SMAD2/3 蛋白表达及分布。

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- β -1-N 和 SB-431542 的预处理逆转了 *Pg* 对上述分子的调控作用。



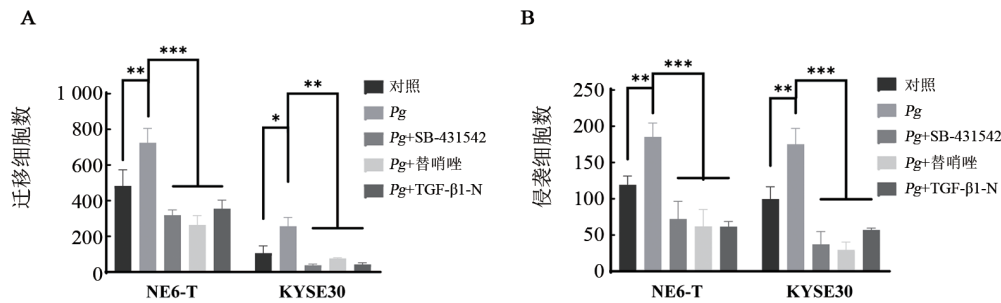
A: WB 法检测不同处理组细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Oct4 和 Snail 蛋白表达; B: 免疫荧光检测不同处理组细胞中 Oct4 蛋白表达。

图 5 *Pg* 通过激活 TGF- β 1 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

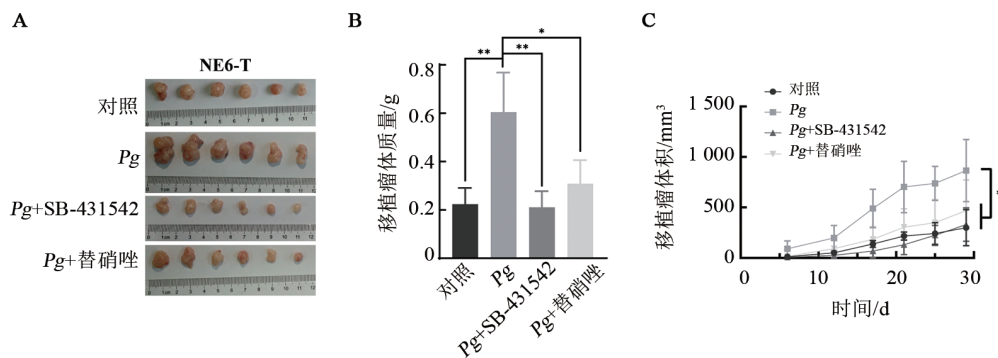
Transwell 小室实验结果(图 6)表明, SB-431542 预处理能够阻断 *Pg* 诱导的 NE6-T 细胞和 KYSE30 细胞的迁移和侵袭能力增加(均 $P < 0.01$)。裸鼠皮下移植瘤实验结果(图 7)表明, *Pg* 感染明显促进了 NE6-T 细胞在裸鼠皮下生长($P < 0.01$), *Pg* 感染的 NE6-T 细

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- β 1 促进 ESCC 细胞的迁移和侵袭



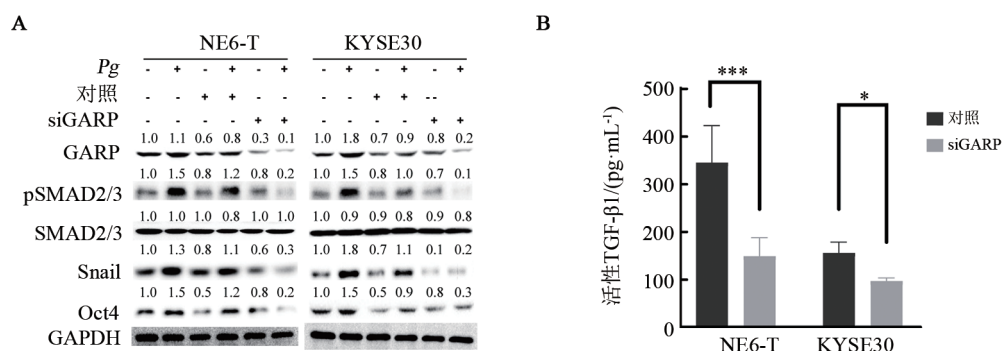
A: 各组裸鼠皮下移植瘤; B: 各组裸鼠皮下移植瘤质量; C: 各组裸鼠移植瘤体积变化。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 7 *Pg* 通过 TGF- β 1 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。

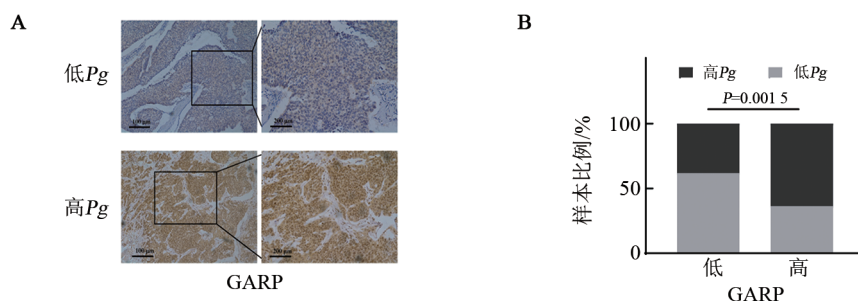


A:WB法检测不同处理组细胞中GARP、pSMAD2/3、SMAD2/3、Snail和Oct4蛋白的表达;B:ELISA试剂盒检测不同处理组细胞培养上清液中活性TGF-β1蛋白的表达。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

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)^[7]。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^[8]。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^[6]。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^[1-2]。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^[3,9]。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^[10-11]。

TGF- β 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^[12-15]。正常生理条件下,TGF- β 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^[16]。因此,由 TGFBR1、TGFBR2、SMAD2、SMAD3、SMAD4 等基因突变或杂合性缺失造成的 TGF- β 通路失活见于多种肿瘤,参与肿瘤发生,并与预后密切相关^[17-19]。

哺乳动物中,TGF- β 亚家族包含三个异构体:TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 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- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 发挥不同的生理功能,TGF- β 1 广泛表达于多种人类肿瘤^[18,20]。机体细胞合成的 TGF- β 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- β ,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- β 的组织分布和活性^[21-23]。机体内非活性的 TGF- β 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^[24-25]。Treg 细胞表面穿膜糖蛋白 GARP 作为锚定蛋白,与 TGF- β 具有超高亲和力,能够与整合素 α V β 6 或 α V β 8 的 RGD 基序协同作用,释放出活性 TGF- β ^[22]。本研究证实,*Pg* 能够上调 ESCC 细胞表面的 GARP,介导 TGF- β 1 激活,ESCC 中 *Pg* 感染与 GARP 呈正相关,提示 GARP 是阻断 TGF- β 活性及下游信号激活的潜在靶点分子。

活性的 TGF- β 与 II 型 TGF- β 受体(TGF- β 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- β 受体(TGF- β R I),肿瘤中最常见的 TGF- β 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^[18,26]。本研究证实,ESCC 细胞感染 *Pg* 后,磷酸化 SMAD2/3 升高,TGF- β 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- β /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- β 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- β /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- β 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- β in homeostasis and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 807-820. DOI: 10.1038/nrc1208.
- [14] MASSAGUÉ J, SHEPPARD D. TGF- β 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- β 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- β 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- β /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- β 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 β [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- β 1 signal designated by LRR33 and integrin α V β 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- β 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- β 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