

网络出版时间:2024-09-25 09:40:33 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240924.1715.017

牙龈卟啉单胞菌通过 miR-21-5p/RASA1/ERK 信号通路促进食管鳞癌自噬

杜玉博¹, 焦叶林², 程月月³, 程浩东³, 茹艺³, 梁高峰¹, 高社干³, 齐义军³

(¹ 河南科技大学基础医学与法医学院, 洛阳 471023; ² 洛阳市第一人民医院病理科, 洛阳 471002;

³ 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, 河南省微生物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, 洛阳 471003)

摘要 目的 探讨牙龈卟啉单胞菌(Pg)促进食管鳞癌(ESCC)细胞自噬发生的分子机制。方法 Pg感染 siAtg7 或氯喹(CQ)预处理的 KYSE70 细胞和 KYSE140 细胞, Western blot 检测 Atg7、LC3-II/LC3-I 和 p62 蛋白, 荧光共聚焦显微镜检测 mRFP-GFP-LC3 标记 ESCC 细胞自噬流, CCK-8 法检测 ESCC 细胞活性, 迁移小室检测 ESCC 细胞迁移及侵袭能力。miR-21-5p inhibitor、RASA1 过表达或 U0126 分别阻断 miR-21-5p/RASA1/ERK 信号通路, 如上检测自噬相关表型变化。免疫组化检测 ESCC 组织中 Pg 丰度和 LC3 蛋白表达, RT-PCR 检测 ESCC 及其癌旁组织中 miR-21-5p 的表达, 统计分析 Pg、LC3 和 miR-21-5p 相关性。结果 Pg 感染诱导 KYSE70 细胞和 KYSE140 细胞中 LC3-II/LC3-I 蛋白表达上调、p62 蛋白表达下调, 增加了 mRFP-GFP-LC3 标记细胞中的红色、绿色和黄色荧光斑点数目和荧光强度, 同时促进 KYSE70 细胞和 KYSE140 细胞增殖、迁移和侵袭能力增加, 上述 Pg 诱导的 ESCC 细胞表型改变被 CQ 或 siAtg7 预处理逆转。miR-21-5p inhibitor、U0126 或 RASA1 过表达质粒的预处理, 也同样逆转了 Pg 对 ESCC 细胞自噬的促进作用。Pg 丰度与 miR-21-5p、LC3 蛋白表达呈正相关。结论 Pg 通过 miR-21-5p/RASA1/ERK 信号通路促进 ESCC 自噬发生。

关键词 食管鳞癌; 牙龈卟啉单胞菌; 自噬; miR-21-5p; RASA1; ERK

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1621-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.017

自噬是由溶酶体介导的高度保守的保护机制, 对胞质内毒性大分子物质、细胞器等成分自我消化降解, 维持细胞内的稳态^[1]。在肿瘤发生早期, 自噬能够消除病变细胞, 抑制肿瘤发生; 在肿瘤进展晚期, 自噬通过增加细胞内物质循环利用, 提高肿瘤细胞的存活能力, 促进肿瘤演进^[2]。

细菌、病毒等微生物是肿瘤微环境中的重要组成部分之一。肿瘤微环境中的细菌通过改变肿瘤细胞的免疫微环境促进肿瘤发生和发展^[3]。富集于结直肠癌组织的具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, Fn)能够诱导 ULK1 和 Atg7 表达升高, 进而激活自噬, 导致结直肠癌复发和预后不良^[4]。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, Pg)感染的食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)细

胞 CE81T 和 TE2 中, LC3-II/LC3-I 表达升高, 表明 Pg 感染激活了 ESCC 细胞自噬的发生, 但详尽的分子机制不明^[5]。该研究用 ESCC 细胞及组织作为研究对象, 观察 Pg 感染的 ESCC 细胞及组织中 miR-21-5p/RASA1/ERK 信号通路相关分子的变化, 揭示 Pg 通过 miR-21-5p/RASA1/ERK 信号通路增强 ESCC 自噬, 促进 ESCC 进展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 ESCC 组织样本 92 例手术切除的 ESCC 和癌旁组织样本来自河南科技大学第一附属医院。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, 项目伦理号: 2022-03-B110。

1.1.2 主要试剂和仪器 一抗包括: LC3 (货号 12741)、p62 (货号 88588)、ERK (货号 4695)、pERK (货号 4370)、GAPDH 兔一抗 (货号 5174) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; RASA1

2024-08-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81872037); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(编号: LHGJ20210583)

作者简介: 杜玉博, 男, 硕士研究生;

齐义军, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: qiyijun@haust.edu.cn

(货号 AB2922) 购自英国 Abcam 公司;二抗包括:HRP 标记的兔二抗(货号 7074S)和鼠二抗(货号 7076S)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;驴抗兔 Alexa Fluor488(货号 A-11094)和驴抗鼠 Alexa Fluor555 荧光抗体(货号 A-31570)均购自美国 Invitrogen 公司。RPMI 1640 细胞培养基(货号 SH30027.01)购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 货号 SA210407)购自美国 Gibco 公司,BCA 蛋白定量试剂盒(货号 CW0014)购自江苏康为世纪公司;Trypticase soy broth(货号 286210)、酵母提取物(货号 211929)和 Superignal West 化学发光底物(货号 34080)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;TRIzol(货号 15596026)和 Lipofectamine 3000(货号 L3000001)购自美国 Invitrogen 公司;HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(货号 R211)和 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix(货号 Q111)购自南京 Vazyme 公司;Hemin(货号 H140872)购自美国 Aladdin 公司;转染试剂及 siRNA、过表达质粒购自上海吉玛制药技术有限公司;自噬抑制剂氯喹(chloroquine, CQ; 货号 HY-17589A)购自美国 MedChemExpress 公司;ERK 阻断剂 U0126(货号 GC12807)购自美国 GLP BIO 公司。组织切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司,型号 Panoramic MIDI);光学显微镜(日本 Nikon 公司,型号 ECLIPSE Ni-E);透射电镜(日本 HITACHI 公司,型号 HT7800);凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司,型号 ChemiDoc XRS+);激光共聚焦显微镜(德国蔡司公司,型号 LSM800)。

1.2 方法

1.2.1 Pg 和 ESCC 细胞培养 KYSE70 细胞和 KYSE140 细胞由河南科技大学第一附属医院肿瘤表观遗传重点实验室保存,用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。Pg 33277 来源于 ATCC 细胞库,培养于含 10% CO₂、10% H₂ 和 80% N₂ 的 37 °C 厌氧培养箱中,取对数生长期 Pg 以感染复数(multiplicity of infection, MOI)10 感染 ESCC 细胞。

1.2.2 Western blot 用 RIPA 裂解缓冲液提取细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白 SDS-PAGE 电泳 40 min 后,电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,4 °C 一抗(1:1 000)过夜孵育。次日取出洗膜并用二抗(1:1 000)室温孵育 1 h,再进行洗膜并用 SuperSignal West 化学发光液孵育 5 min,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 软件量化分析蛋白条带灰度值。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活性 取对数生长期 KYSE70 细胞和 KYSE140 细胞种植于 96 孔板,Pg 感染和未感染细胞培养 6、24、48、72 h 后,每孔中加入 10 μl 的 CCK-8,继续培养 2 h,450 nm 测定吸光度(optical density, OD),绘制细胞增殖曲线。

1.2.4 细胞迁移和侵袭实验 各组细胞分别接受不同处理后,1 × 10⁵ 个细胞重悬于 250 μl 无血清培养基中,接种于 Transwell 小室中进行细胞迁移实验,Matrigel 包被的 Transwell 小室用于细胞侵袭实验,小室下层加入 500 μl 含 10% 血清培养基,适时终止实验,结晶紫染色,显微镜下拍照,Image J 软件计数细胞。

1.2.5 RNA 提取及 RT-PCR 各组细胞进行相应处理后,TRIzol 提取 RNA,使用酶标仪测定在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值,用 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行反转录,合成 cDNA;PCR 检测目的基因表达应用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix, 2^{-ΔΔC_T} 方法计算每个基因的 mRNA 表达量。

1.2.6 mRFP-GFP-LC3 荧光标记 携带 mRFP-GFP-LC3 慢病毒感染 KYSE70 细胞和 KYSE140 细胞,嘌呤霉素筛选、建立稳定表达 mRFP-GFP-LC3 细胞。对数生长期细胞接受相应处理,固定、封闭非特异性免疫反应,共聚焦显微镜采集红色和绿色荧光信号。由于 GFP 荧光信号在溶酶体的酸性环境(pH < 5)中被猝灭,因此 RFP 单色荧光代表自噬溶酶体,GFP 和 RFP 双色荧光代表自噬小体。

1.2.7 免疫荧光 将对数期生长的细胞接种于玻璃底细胞培养皿中,细胞培养至 50% ~ 70% 融合度时进行相关处理,实验终止后,细胞进行甲醛固定、透化、封闭,孵育相应的一抗和荧光标记的二抗、DAPI 核复染等处理,共聚焦显微镜下观察、拍照。

1.2.8 免疫组化 应用 PV-9000 试剂盒进行 Pg 和 LC3 免疫组化检测。92 例 ESCC 组织进行包埋、切片、烤片、脱蜡、水化,EDTA 抗原修复液于 95 ~ 100 °C 进行抗原修复 20 min,冷却至室温后,分别加入鼠/兔抗 Pg(1:2 000)和鼠/兔抗 LC3(1:500)一抗 4 °C 过夜孵育,抗鼠/兔二抗(1:200)孵育 1 h, DAB 显色。免疫组化评分根据切片中胞质及胞核着色的阳性细胞数和着色强度进行综合评分,评估 Pg 和 LC3 表达的阳性率。

1.3 统计学处理 用 SPSS 26.0 和 Graphpad Prism 软件进行数据统计分析,两组样本之间的差异分析采用配对 *t* 检验,多组样本之间的差异分析采用单

因素方差分析; Pg 丰度、miR-21-5p 和 LC3 蛋白表达的相关性分析采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Pg 激活 ESCC 细胞自噬 Pg 感染 KYSE70 细胞和 KYSE140 细胞后, Western blot 结果显示 LC3- II/LC3- I 表达比值明显升高, 同时 p62 蛋白表达降低; 应用自噬抑制剂 CQ 处理各组细胞, 发现 LC3- II/LC3- I 表达比值进一步升高, 并逆转了 p62 蛋白表达降低, 见图 1A。同样, mRFP-GFP-LC3 标记的 ESCC 细胞也显示, Pg 感染 ESCC 细胞 6 h 后, 红色、绿色和黄色荧光斑点均增加; CQ 抑制自噬后, 黄色荧光斑点进一步增加, 表明 Pg 感染促进了 ESCC 自噬流活化, 见图 1B。此外, 透射电子显微镜观

察显示, Pg 感染的 KYSE70 细胞和 KYSE140 细胞的自噬小体显著增加, 见图 1C。上述结果表明, Pg 感染促进了 ESCC 细胞自噬形成。

2.2 Pg 通过自噬促进 ESCC 细胞增殖、迁移、侵袭

Western blot 结果显示, Atg7 沉默明显降低了 Atg7 蛋白表达, 同时逆转了 LC3- II/LC3- I 比值升高和 p62 蛋白表达的降低, 见图 2A。Pg 感染的 KYSE70 siControl 细胞和 KYSE140 siControl 细胞的增殖、迁移、侵袭等显著高于未感染对照组细胞, CQ 或 Atg7 沉默能够逆转 Pg 对细胞增殖 ($F = 22.18$, $P < 0.001$; $F = 11.31$, $P < 0.001$)、迁移 ($F = 202.90$, $P < 0.001$; $F = 73.83$, $P < 0.001$) 和侵袭 ($F = 59.50$, $P < 0.001$; $F = 55.03$, $P < 0.001$) 的促进作用, 见图 2B-2D。上述结果表明, Pg 通过自噬促进 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭。

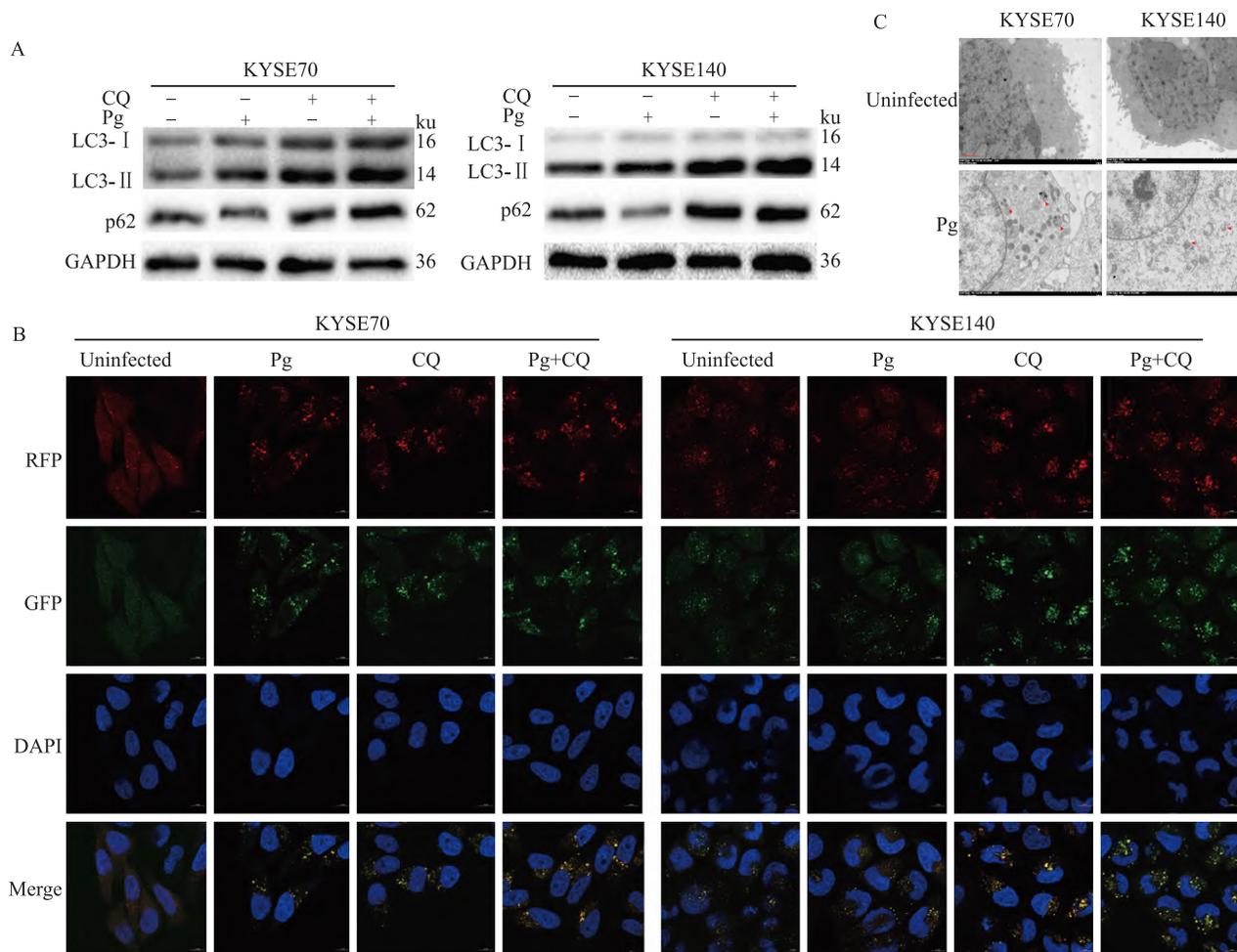


图 1 Pg 激活 ESCC 细胞自噬

Fig. 1 Pg activated autophagy in ESCC cells

A: The protein levels of LC3, p62 and GAPDH in KYSE70 cells and KYSE140 cells treated with different treatments were detected using Western blot; B: The immunofluorescence images of autophagosomes and autophagolysosomes in KYSE70 cells and KYSE140 cells were detected using confocal microscopy; the scale is 10 μm ; C: Transmission electron microscopy images of autophagosomes in KYSE70 and KYSE140 cells treated with Pg or PBS; the scale is 2 μm ; Red triangular arrow: autophagosome.

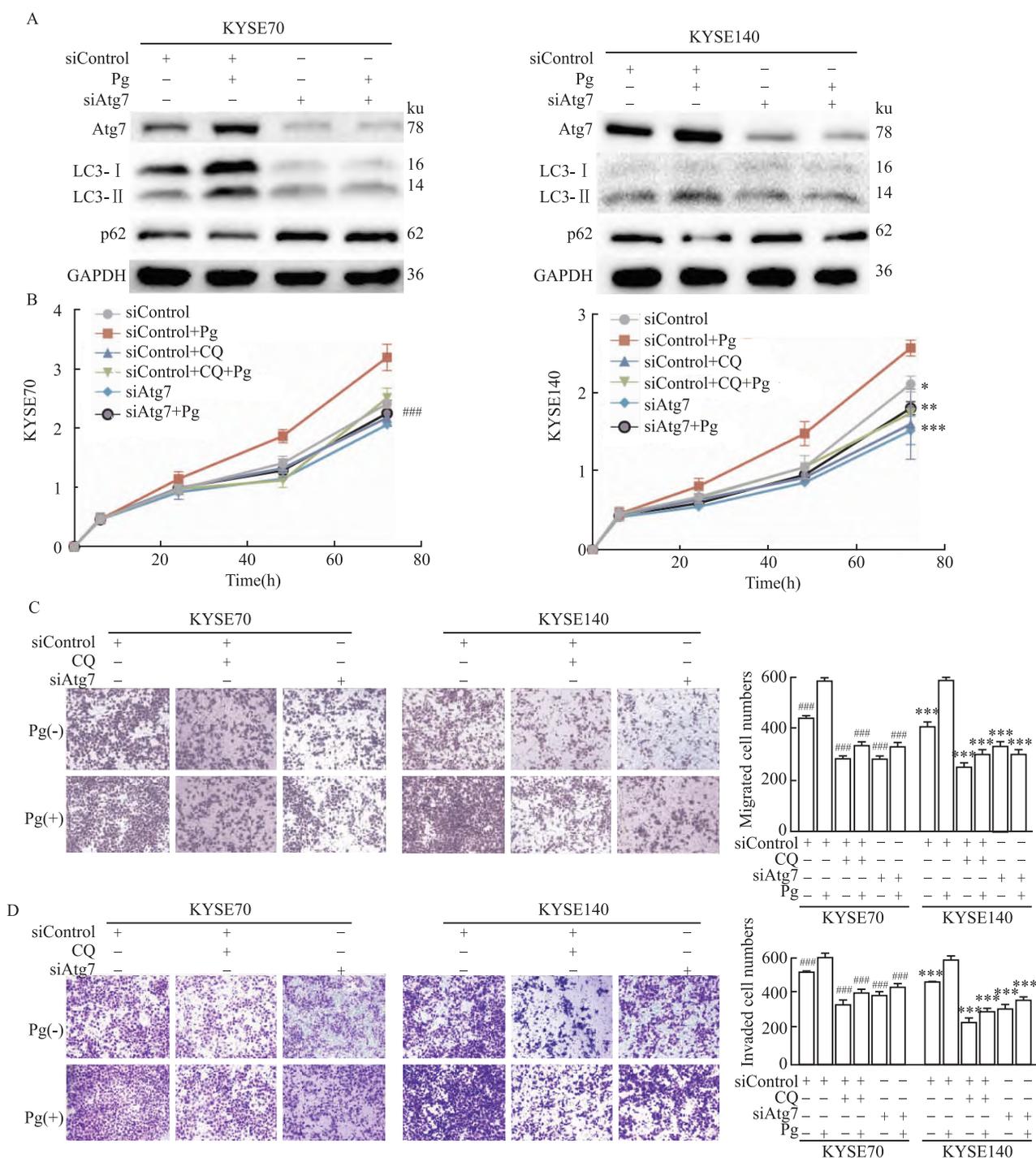


图 2 Pg 通过自噬促进 ESCC 细胞增殖、迁移、侵袭

Fig. 2 Pg promotes the proliferation, migration and invasion of ESCC cells through autophagy

A: The protein levels of Atg7, LC3, p62 and GAPDH in KYSE70 cells and KYSE140 cells treated with different treatments were detected by Western blot; B: CCK-8 assay was used to detect cell activity at 6, 24, 48 and 72 h; C: Transwell chamber was used to detect cell migration ability under different conditions; D: Transwell chamber was used to detect the cell invasion ability under different conditions; ### $P < 0.001$ vs KYSE70 control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs KYSE140 siControl + Pg group.

2.3 Pg 通过 miR-21-5p/RASA1/ERK 信号通路促进 ESCC 自噬 Pg 感染 KYSE70 细胞和 KYSE140 细胞后, RASA1 蛋白表达降低, pERK 表达升高, 表明 Pg 激活了 ERK 信号通路。KYSE70 细胞

和 KYSE140 细胞中沉默 miR-21-5p 表达后, RASA1 蛋白表达升高, pERK 表达降低, 并阻断了 Pg 诱导的 LC3-II/LC3-I 蛋白表达比值升高和 p62 蛋白表达的降低, 提示 Pg 可能通过 miR-21-5p/RASA1/

ERK 信号通路激活 ESCC 自噬并促进 ESCC 恶性进展,见图 3A。此外,mRFP-GFP-LC3 标记 ESCC 细胞的双荧光实验表明,Pg 诱导的红色、绿色和黄色荧光斑点的数目和强度增加,同样被 miR-21-5p 沉默所抑制,见图 3B。ERK 的抑制剂 U0126 和过表达 RASA1 也得到了类似的效果,见图 3C - 3F。上述结果表明,Pg 通过 miR-21-5p/RASA1/ERK 信号通路激活 ESCC 自噬,促进 ESCC 进展。

2.4 ESCC 组织中 Pg 丰度与 miR-21-5p、LC3 表达呈正相关 应用免疫组化法检测 92 例 ESCC 组

织中 Pg 丰度和 LC3 蛋白的表达,见图 4A。RT-PCR 检测 ESCC 及其癌旁组织中 miR-21-5p 的表达($P < 0.001$),见图 4B。结果显示:ESCC 组织中 Pg 阳性百分率为 37% (34/92),在 34 例 Pg 阳性 ESCC 组织中,miR-21-5p 阳性和阴性表达的百分率分别为 70.6% (24/34)、29.4% (10/34) ($P < 0.001$),LC3 阳性和阴性表达的百分率分别为 67.6% (23/34)、32.4% (11/34) ($P < 0.001$),见图 4C。上述结果表明,ESCC 中 Pg 感染通过诱导 miR-21-5p 表达升高,促进 ESCC 进展,导致 ESCC 患者预后不良。

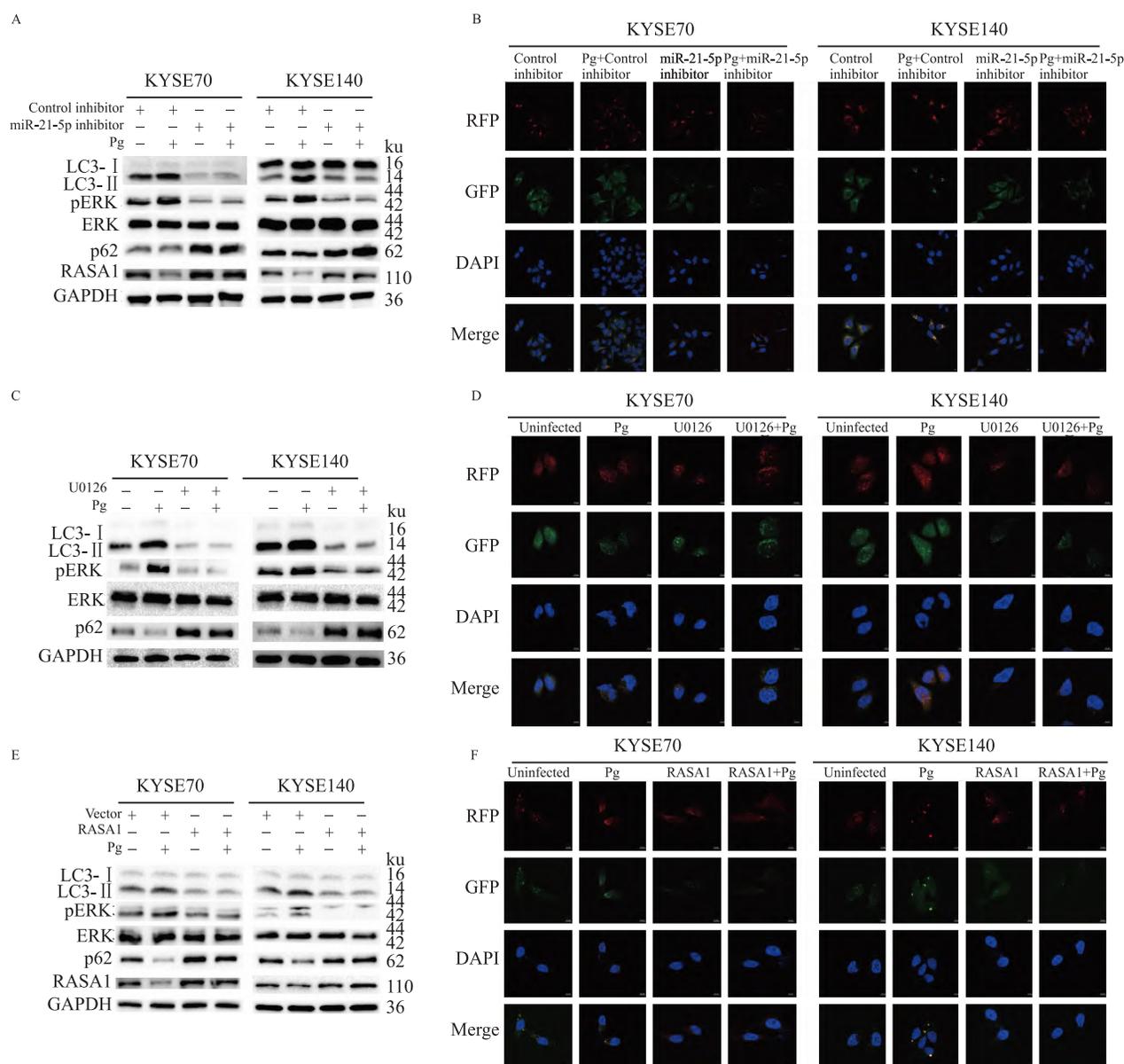


图 3 Pg 通过 miR-21-5p/RASA1/ERK 促进 ESCC 自噬

Fig. 3 Pg promotes autophagy in ESCC through miR-21-5p/RASA1/ERK

A, C, E: Western blot was used to detect the protein levels of autophagy related molecular proteins in KYSE70 cells and KYSE140 cells treated with different treatments; B, D, F: Immunofluorescence images of autophagosomes and autophagolysosomes in KYSE70 cells and KYSE140 cells were detected by confocal microscope with scales of 10 μm and 20 μm .

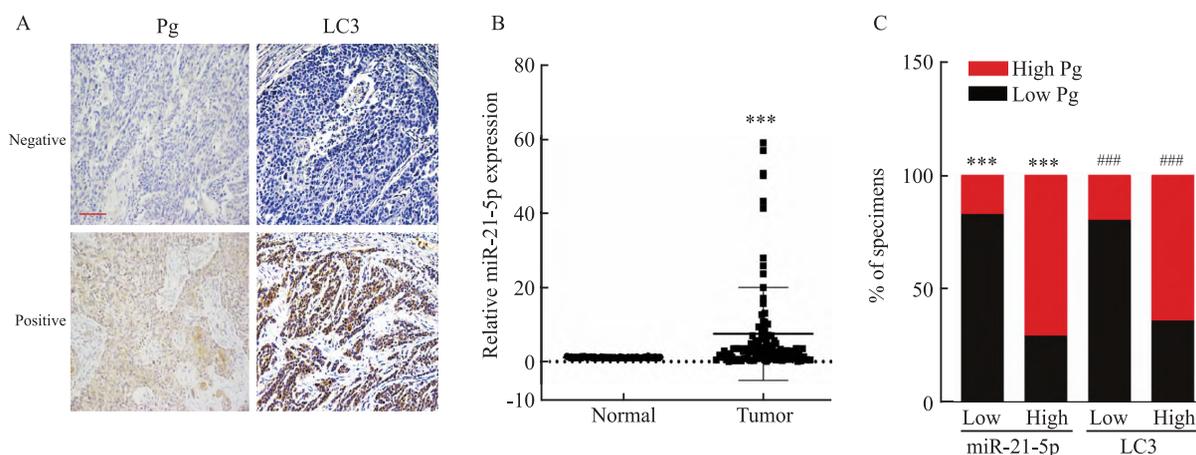


图4 ESCC 组织中Pg丰度与miR-21-5p、LC3表达呈正相关

Fig. 4 The abundance of Pg in ESCC was positively correlated with the expressions of miR-21-5p and LC3

A: Immunohistochemistry was used to show the staining of Pg and LC3 in ESCC; The scale is 100 μm; B: The expression of miR-21-5p in ESCC and its adjacent tissues was detected by RT-PCR; *** $P < 0.001$ vs Normal; C: Correlation between Pg and miR-21-5p, Pg and LC3; *** $P < 0.001$ vs miR-21-5p group; ### $P < 0.001$ vs LC3 group.

3 讨论

约20%的人类肿瘤与病毒、细菌等微生物感染密切相关^[3]。食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,生存预后较差^[6]。河南食管癌高发区林州的一项前瞻性队列研究对40~69岁28 868名无癌当地居民进行了5.25年随访,共确诊620例食管癌、431例贲门癌和102例胃癌,Cox风险比例模型发现牙齿缺失比例、中位数和首颗牙缺失的中位年龄是所有三种类型肿瘤发生的危险因素^[7]。应用16S rRNA基因测序技术分析25例ESCC患者和50例非癌对照人群的口腔微生物组,发现口腔中Pg丰度增高是ESCC发生的危险因素^[8]。由Pg、牙密螺旋体菌和福赛斯坦纳菌所构成的红色复合体是牙周炎的重要致病因素,也是成年人牙齿脱落的主要原因^[8]。上述研究结果提示,Pg可能是驱动ESCC发生发展的潜在致病菌。

课题组前期已报道了Pg能够增加ESCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[9-10],应用免疫组化检测了312例ESCC组织中Pg感染特征,发现45% (141/312)ESCC组织中具有Pg,并且Pg高丰度与肿瘤浸润深度、淋巴结转移和TNM分期呈正相关;在85例接受新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy, NACT)的ESCC患者中,仅有40% (16/40)Pg感染ESCC患者(40/85)对NACT治疗敏感,显著低于66.7% (30/45)Pg未感染的ESCC患者^[10]。同样,

CRC组织中Fn丰度高于癌旁组织,并且Fn丰度与CRC复发呈正相关;Fn感染的结直肠癌细胞HCT116和HT29对奥沙利铂和5-氟尿嘧啶的敏感性降低,应用CQ、ULK1敲降或Atg7敲降抑制自噬,恢复了Fn感染CRC细胞对奥沙利铂和5-氟尿嘧啶的敏感性,表明自噬介导了CRC化疗耐药性产生^[4]。

本研究显示Pg感染ESCC细胞后,LC3-II/LC3-I蛋白表达比值升高而p62蛋白表达降低,CQ阻断自噬流实验证实Pg增进了ESCC自噬活性,抑制自噬能够阻断Pg对ESCC增殖、迁移和侵袭的促进作用,提示抑制自噬是阻断ESCC恶性演进的有效策略之一。另有研究^[11]表明,Pg感染的ESCC细胞miR-194表达升高,进而靶向抑制GRHL3和PTEN蛋白表达,激活PI3K/Akt信号通路,促进ESCC增殖和侵袭。

Pg是一种革兰阴性的口腔关键致病菌,具有高度侵袭性,分布于人体多种组织和器官,因此除引起牙周病外,还与其他多种疾病发生发展密切相关^[12]。Pg能够诱导ESCC细胞高表达Cyclin D3和Cyclin E,促进ESCC细胞G1-S期转换,进入S期,促进细胞增殖;同时,Pg感染的ESCC细胞还激活JAK/STAT3信号通路,阻断Caspase3激活,抑制ESCC细胞凋亡^[10]。Pg经灌胃处理C57BL/6鼠原位MC38直肠癌模型2周后,直肠癌组织中CD11b⁺髓系细胞显著增多,炎症因子TNF-α、IL-6和IL-1β表

达升高,激活 NLRP3 和 procaspase1^[13]。此外,Pg 感染还能够激活 MAPK/ERK 信号通路,促进结直肠癌细胞增殖^[14]。另有研究^[15]表明,Fn 感染结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 细胞 HCT116 和 LoVo 后,激活 miR-21-5p/RASA1/pERK 信号通路,促进结直肠癌的发生发展,因此,本研究分析了 miR-21-5p/RASA1/ERK 在 Pg 诱导的 ESCC 自噬中的作用。Fn 感染能够激活 miR-21/RASA1 通路,Fn 处理的 AOM/DSS miR-21a^{-/-} 鼠结直肠癌肿瘤数目和肿瘤大小明显小于野生型鼠。本研究表明,Pg 通过 miR-21-5p 抑制 RAS GTPase 酶激活蛋白 RASA1 激活 MAPK/ERK 信号通路,增进 ESCC 自噬活性,促进 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭;ESCC 组织中,miR-21-5p 表达和 Pg 丰度呈正相关,是 ESCC 预后不良的分子标志物。

本研究亦存在一定的局限性。首先,本研究的 ESCC 临床样本量较少,后续相关研究需扩大临床样本;其次,为避免实验和临床试验中的主观偏差和个人偏好,后续可能进行必要的双盲临床试验,明确 Pg 及其诱导的 miR-21-5p/RASA1/pERK 的临床应用价值。

综上所述,本研究阐明了 Pg 通过激活 miR-21-5p/RASA1/ERK 信号通路促进 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭,为 Pg 感染的 ESCC 临床治疗提供了潜在新靶点。

参考文献

- [1] Debnath J, Gammoh N, Ryan K M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(8):560-75. doi:10.1038/s41580-023-00585-z.
- [2] Zhu J F, Huang W, Yi H M, et al. Annexin A1-suppressed autophagy promotes nasopharyngeal carcinoma cell invasion and metastasis by PI3K/AKT signaling activation [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(12):1154. doi:10.1038/s41419-018-1204-7.
- [3] El Tekle G, Garrett W S. Bacteria in cancer initiation, promotion and progression[J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23(9):600-18. doi:10.1038/s41568-023-00594-2.
- [4] Yu T, Guo F, Yu Y, et al. Fusobacterium nucleatum promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy[J]. Cell, 2017, 170(3):548-63. doi:10.1016/j.cell.2017.07.008.
- [5] Chen M F, Lu M S, Hsieh C C, et al. Porphyromonas gingivalis promotes tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cell Oncol (Dordr), 2021, 44(2):373-84. doi:10.1007/s13402-020-00573-x.
- [6] 黄红芳,卢香云,孙梦菲,等. SP1 在食管鳞癌组织中的表达及其对食管鳞状细胞增殖和凋亡的影响[J]. 安徽医科大学学报,2023,58(12):2031-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.007.
- [6] Huang H F, Lu X Y, Sun M F, et al. Expression of SP1 in esophageal squamous cell carcinoma and its effect on the proliferation and apoptosis of esophageal squamous cell [J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(12):2031-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.007.
- [7] Abnet C C, Qiao Y L, Mark S D, et al. Prospective study of tooth loss and incident esophageal and gastric cancers in China [J]. Cancer Causes Control, 2001, 12(9):847-54. doi:10.1023/a:1012290009545.
- [8] Peters B A, Wu J, Pei Z, et al. Oral microbiome composition reflects prospective risk for esophageal cancers [J]. Cancer Res, 2017, 77(23):6777-87. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1296.
- [9] Gao S, Liu K, Jiao Y, et al. Selective activation of TGFβ signaling by P. gingivalis mediated upregulation of GARP aggravates esophageal squamous cell carcinoma [J]. Am J Cancer Res, 2023, 13(5):2013-29.
- [10] Gao S, Liu Y, Duan X, et al. Porphyromonas gingivalis infection exacerbates oesophageal cancer and promotes resistance to neoadjuvant chemotherapy [J]. Br J Cancer, 2021, 125(3):433-44. doi:10.1038/s41416-021-01419-5.
- [11] Liang G, Wang H, Shi H, et al. Porphyromonas gingivalis promotes the proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma through the miR-194/GRHL3/PTEN/Akt axis [J]. ACS Infect Dis, 2020, 6(5):871-81. doi:10.1021/acinfdis.0c00007.
- [12] Reyes L. Porphyromonas gingivalis [J]. Trends Microbiol, 2021, 29(4):376-7. doi:10.1016/j.tim.2021.01.010.
- [13] Wang X, Jia Y, Wen L, et al. Porphyromonas gingivalis promotes colorectal carcinoma by activating the hematopoietic NLRP3 inflammasome [J]. Cancer Res, 2021, 81(10):2745-59. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-3827.
- [14] Mu W, Jia Y, Chen X, et al. Intracellular Porphyromonas gingivalis promotes the proliferation of colorectal cancer cells via the MAPK/ERK signaling pathway [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:584798. doi:10.3389/fcimb.2020.584798.
- [15] Yang Y, Weng W, Peng J, et al. Fusobacterium nucleatum increases proliferation of colorectal cancer cells and tumor development in mice by activating toll like receptor 4 signaling to nuclear factor-κB, and up-regulating expression of microRNA-21 [J]. Gastroenterology, 2017, 152(4):851-66. doi:10.1053/j.gastro.2016.11.018.

***Porphyromonas gingivalis* promotes autophagy in esophageal squamous cell carcinoma via the miR-21-5p/RASA1/ERK axis**

Du Yubo¹, Jiao Yelin², Cheng Yueyue³, Cheng Haodong³, Ru Yi³, Liang Gaofeng¹, Gao Shegan³, Qi Yijun³

(¹*School of Basic Medicine and Forensic Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023;*

²*Dept of Pathology, Luoyang First People's Hospital, Luoyang 471002;*³*College of Clinical Medicine*

of Henan University of Science and Technology, The First Affiliated Hospital of Henan University of

Science and Technology Cancer Hospital, Henan Provincial Key Laboratory of Esophageal Cancer Prevention

and Treatment, Henan Provincial Key Laboratory of Microecology and Esophageal Cancer Prevention and Treatment,

Henan Provincial Key Laboratory of Tumor Epigenetics, Luoyang 471003)

Abstract Objective To investigate the molecular mechanism underlying *Porphyromonas gingivalis* (Pg)-induced autophagy in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** After Pg infected KYSE70 cells and KYSE140 cells pretreated with siAtg7 or Chloroquin (CQ), Western blot was used to measure protein levels of Atg7, LC3-II/LC3-I, and p62; Immunofluorescent confocal imaging analysis was used to detect autophagosome and autolysosome; CCK-8 assay was used to test cell viability; Transwell assay was used for ESCC cell migration and invasion potentials. Likewise, miR-21-5p inhibitor, RASA1 overexpression plasmid, or U0126 were used to block miR-21-5p/RASA1/ERK signaling pathway prior to Pg infection, followed by the aforementioned methods. In addition, immunohistochemistry was used to examine Pg abundance and LC3 protein levels, and RT-PCR was used to evaluate miR-21-5p expression in ESCC and adjacent tissue samples, followed by correlation analyses between Pg and LC3, and Pg and miR-21-5p. **Results** Pg infected KYSE70 cells and KYSE140 cells showed upregulation Atg7 protein and LC3-II/LC3-I protein but downregulation of RASA1 protein and p62 protein, enhanced cell proliferation, migration, and invasion as well as immunofluorescent spots of red, green, and yellow in mRFP-GFP-LC3-labeled ESCC cells. Pretreatment with CQ or siAtg7 abolished the above alterations induced by Pg. Consistently, pretreatment with miR-21-5p inhibitor, U0126, or RASA1 overexpression plasmid also blocked Pg-stimulated autophagy. In ESCC samples, Pg abundance was correlated with upregulation of miR-21-5p and LC3. **Conclusion** Pg promotes autophagy in esophageal squamous cell carcinoma via miR-21-5p/RASA1/ERK signaling pathway.

Key words esophageal squamous cell carcinoma; *Porphyromonas gingivalis*; autophagy; miR-21-5p; RASA1; ERK

Fund programs National Natural Science Foundation of China(No. 81872037); Medical Science and Technology Research Plan Joint Construction Project of Henan Province(No. LHGJ20210583)

Corresponding author Qi Yijun, E-mail: qiyijun@haust.edu.cn