

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: 牙龈卟啉单胞菌通过 EGFR/GSK3 β 通路诱导 EMT 促进食管鳞癌进展及增强对西妥昔单抗耐药的研究

作者: 郎耀武, 陈攀, 张自超, 刘轲, 石林林, 高社干

收稿日期: 2025-07-29

网络首发日期: 2025-09-12

引用格式: 郎耀武, 陈攀, 张自超, 刘轲, 石林林, 高社干. 牙龈卟啉单胞菌通过 EGFR/GSK3 β 通路诱导 EMT 促进食管鳞癌进展及增强对西妥昔单抗耐药的研究[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250912.0933.003>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

牙龈卟啉单胞菌通过 EGFR/GSK3 β 通路诱导 EMT 促进食管鳞癌进展及增强对西妥昔单抗耐药的研究

郎耀武, 陈攀, 张自超, 刘轲, 石林林, 高社干

(河南科技大学临床医学院, 河南科技大学第一附属医院, 河南科技大学肿瘤研究所, 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, 洛阳 471003)

摘要 目的 探讨牙龈卟啉单胞菌 (Pg) 感染对表皮生长因子受体/糖原合酶激酶 3 β (EGFR/GSK3 β) 信号轴的调控作用, 以及对食管鳞癌 (ESCC) 上皮间质转化 (EMT) 和 EGFR 抑制剂—西妥昔单抗 (Ctx) 耐药的影响。**方法** 应用单细胞 RNA 测序进行细胞亚群差异分析, 筛选出感染和非感染 Pg 的 ESCC 组织中差异表达的基因。IHC 检测 ESCC 组织中 Pg 和 EGFR 的表达情况。Western blot、RT-PCR 和 IF 检测 Pg 感染 ESCC 细胞 KYSE70 和 TE1 中 EGFR 的表达情况。用 Pg 和 Ctx 处理 ESCC 细胞, 分为 4 组: 空白对照 (NC) 组、Pg 组、Ctx 组和 Pg+Ctx 组, 采用 CCK-8、平板克隆、细胞划痕和 Transwell 实验检测细胞的增殖、迁移和侵袭能力。Western blot 检测 EMT 和 EGFR/GSK3 β 信号通路相关蛋白及其磷酸化的表达。转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 处理 ESCC 细胞诱导 EMT, 使细胞由上皮表型转变为间充质样表型, 比较 Ctx 对两种表型细胞的作用差异。**结果** Pg 阳性的组织中主要富集上皮细胞, Pg 感染促进 ESCC 细胞中 EGFR 的表达上调。与对照组相比, Pg 处理后增强 ESCC 细胞的增殖、侵袭和迁移能力, 同时增强 ESCC 细胞对 Ctx 的耐药抵抗降低其抑制肿瘤的作用; Pg 通过 EGFR/GSK3 β 信号通路诱导 ESCC 细胞发生 EMT; 与 ESCC 上皮细胞相比, Ctx 对间充质样细胞的抑制作用不明显。**结论** Pg 通过 EGFR/GSK3 β 信号通路诱导 EMT 促进 ESCC 细胞的增殖、侵袭和迁移, 并增强对 Ctx 的耐药。

关键词 牙龈卟啉单胞菌; ESCC; EGFR; EMT; 西妥昔单抗; 肿瘤耐药

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A

2025-07-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 81972571); 河南省医学科技攻关计划项目 (编号: LHGJ20230455); 河南科技大学第一附属医院科技攻关项目 (编号: ZLKFJJ20230502)

作者简介: 郎耀武, 男, 硕士研究生;

高社干, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 通信作者, E-mail:gsg112258@163.com

***Porphyromonas gingivalis* promotes esophageal squamous cell carcinoma progression and enhances cetuximab resistance via EGFR/GSK3 β pathway induced EMT**

Lang Yaowu , Chen Pan , Zhang Zichao , Liu Ke , Shi Linlin , Gao Shegan

(Clinical Medical College of Henan University of Science and Technology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Institute of Oncology of Henan University of Science and Technology, Key Laboratory of Microecology and Esophageal Cancer Prevention and Treatment in Henan Province, Key Laboratory of Epigenetics of Tumors in Henan Province, Luoyang 471003)

Abstract Objective To investigate the regulatory role of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) infection on the EGFR/GSK3 β signaling axis, and its impact on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cetuximab (Ctx) resistance in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** Single cell RNA sequencing was employed to perform differential analysis of cellular subpopulations, identifying differentially expressed genes in ESCC tissues infected and non-infected with Pg. IHC was conducted to assess the expression of Pg and epidermal growth factor receptor (EGFR) in ESCC tissues. Western blot, RT-PCR, and IF staining were performed to evaluate EGFR expression in Pg infected ESCC cell lines KYSE70 and TE1. ESCC cells were treated with Pg and EGFR inhibitor Ctx, and divided into four groups: negative control (NC) group, *P. gingivalis* group, Ctx group, Pg+Ctx group. Cell proliferation, migration and invasion abilities were evaluated using CCK-8, plate cloning, wound healing and Transwell assay. Western blot analysis was performed to detect the expression of EMT and EGFR/GSK3 β signaling pathway-associated proteins and their phosphorylation levels. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) was used to induce EMT in ESCC cells, promoting a transition from the epithelial phenotype to mesenchymal-like phenotype. The differential effects of Ctx on these two phenotypic states were subsequently compared. **Results** Epithelial cells were predominantly enriched in Pg-positive tissues, and Pg infection promoted the upregulation of EGFR expression in ESCC cells. Compared to the NC group, Pg treatment significantly enhanced the proliferation, invasion and migration capabilities of ESCC cells, and also increased chemoresistance to Ctx and reduced its antitumor efficacy. Pg

induced EMT in ESCC cells via the EGFR/GSK3 β signaling pathway. Notably, Ctx exhibited markedly weaker inhibitory effects on mesenchymal-like cells compared to epithelial ESCC cells.

Conclusion Pg promotes ESCC cells proliferation, invasion and migration by regulating EMT through the EGFR/GSK3 β signaling pathway, and enhances chemoresistance to Ctx.

Key words *Porphyromonas gingivalis*; ESCC; EGFR; EMT; Ctx; cancer drug resistance

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81972571); Medical Science and Technology Research Plan Project of Henan Province (No. LHGJ20230455); Science and Technology Research Project of the First Affiliated Hospital of Henan University of Science & Technology (No. ZLKFJJ20230502)

Corresponding author Gao Shegan, E-mail: gsg112258@163.com

食管癌 (esophageal cancer, EC) 作为最常见的消化道恶性肿瘤, 其发病率和病死率在全球范围内较高。中国更是一个食管癌高发大国, 食管鳞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 发病率占到 90% 以上, 是癌症死亡的第 4 大原因^[1]。牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, Pg) 作为慢性牙周炎和牙齿脱落的关键病原体, 可引起慢性炎症和多种感染性疾病并与恶性肿瘤密切相关^[2]。课题组前期研究结果表明, Pg 感染与 ESCC 的发展、预后相关, 且 Pg 可作为 ESCC 早期诊断和预后的生物标志物^[3]。表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 作为一种典型的跨膜受体, 扩增和过表达在 EC 中很常见, 其中 ESCC 占比就达到了 80%^[4], 其异常激活可通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/糖原合成激酶 3 β (phosphatidylinositol 3-kinases/protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 β , PI3K/AKT/GSK3 β) 等下游通路驱动肿瘤增殖、侵袭及化疗抵抗^[5]。尽管 EGFR 靶向药物已应用于临床, 但其靶向治疗 ESCC 的效果似乎并不理想。上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 不仅是肿瘤转移的核心机制, 还可通过重塑细胞表型降低治疗敏感性^[6]。然而, Pg 感染如何调控 ESCC 恶性表型及耐药性的分子机制鲜有报道, 该研究主要探讨 Pg 感染对 EGFR/GSK3 β 通路的调控和对 ESCC 的 EMT 表型及耐药性的作用机制, 旨在为 ESCC 的临床治疗提供理论依据和新方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与 Pg 食管鳞癌细胞 KYSE70、TE1 及 Pg 菌株 ATCC 33277 均来自河南省肿瘤表观遗传重点实验室。

1.1.2 组织样本 7 例单细胞测序样本以及 45 例 ESCC 组织样本来自河南科技大学第一附属医院，所有患者均术后病理学诊断为原发性 ESCC。该研究经河南科技大学第一附属医院医学伦理委员会批准（伦理编号：K-2025-B031）。

1.1.3 试剂 细胞培养基 RPMI 1640、胎牛血清购自武汉普诺赛生命科技有限公司；胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司；预染蛋白分子（WJ103）、超灵敏化学发光检测试剂盒（SQ201）、一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒均购自上海雅酶生物科技有限公司；EGFR 抗体（GB111504）购自武汉塞维尔生物科技有限公司；E-cadherin（3195T）、p-EGFR（3777S）、PI3K（4263S）、P-PI3K（4228S）、AKT（4691T）、P-AKT（4060S）、GSK3 β （9315S）、p-GSK3 β （9323S）、N-cadherin（14215S）、Vimentin（5741S）均购自美国 Cell Signaling Technology 公司；BCA 定量试剂盒（CW0014S）、SDS-PAGE Loading Buffer（5 $\times$ ）（CW0027）、GAPDH（CW0100S）均购自江苏康为世纪生物科技有限公司；RIPA 裂解液（89901）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；Pg 抗体（ANT0085）购自意大利 DIATHEVA 公司；免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司；Matrigel 凝胶（B-P-00002-4）购自美国 Biozellen 公司；西妥昔单抗（A200009）购自美国 Selleck Chemicals LLC 公司；重组人 TGF- β 1 蛋白 (Active)（ab50036）购自英国 Abcam 公司；RT-PCR 实验所需引物合成于上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞及细菌培养 ESCC 细胞均选用 RPMI 1640 培养基（10% FBS），于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。KYSE70 和 TE1 细胞的上皮-间充质转化：完全培养基中加入 5 ng/mL 转化生长因子 β 1（transforming growth factor- β 1, TGF- β 1），换液传代至第 5 代用于实验。Pg 于 37 °C 厌氧条件下（85% N₂、10% H₂ 和 5% CO₂）培养。取对数生长期的菌液以 MOI 10 感染 ESCC 细胞。

1.2.2 单细胞测序 按照 Pg 含量高低比 4：3 收集食管鳞癌样本，将样本解离为单细胞后建立文库后测序，利用生信分析技术对单细胞 mRNA 测序结果进行聚类分群和差异基因分析。

1.2.3 免疫组化 免疫组化检测 ESCC 组织中 Pg（抗体浓度 1：400）与 EGFR（抗体浓度 1：1 000）表达。免疫组化评分采用文献^[7]方法。

1.2.4 Western blot 蛋白印迹分析 实验各组细胞用 RIPA 裂解液提取总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，定量后加入 Loading buffer 金属浴 100 °C 变性。取 30 μ g 蛋白上样，经 SDS-PAGE

凝胶电泳分离，转至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭，孵育相应一抗（1：1 000～1：2 000），4℃孵育过夜；TBST 清洗后室温孵育对应二抗（1：2 000）1 h，ECL 超敏显色液曝光，使用 Image J 软件分析灰度值。

1.2.5 RT-PCR Pg 感染细胞后于 24 h 收集细胞，用 TRIzol 法提取细胞的总 RNA，测定浓度后将 RNA 逆转录成为 cDNA 以此为模板进行 PCR。以 GAPDH 作为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算目的基因的 mRNA 相对表达量。具体引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列表

Tab.1 Primer sequences of RT-PCR	
Gene name	Primer sequences (5'-3')
EGFR	F: GTGTGCCACCTGTGCCATCC
	R: GCCACCACCAGCAGCAAGAG
GAPDH	F: GTGGACCTGACCTGCCGTCTAG
	R: GAGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC

1.2.6 免疫荧光实验 取对数生长期的 ESCC 细胞， 2×10^3 个/皿接种于共聚焦皿中，Pg 感染 24 h，洗涤、固定、透化、封闭，孵育 EGFR 一抗（1：500）和荧光标记的二抗（1：200），DAPI（1：100）复染细胞核，共聚焦显微镜下观察、拍照。

1.2.7 CCK-8 增殖实验 将 ESCC 细胞以 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，经不同处理后在不同时间点加入 10 μ L/孔的 CCK-8 试剂，37℃下避光孵育 2 h，测量并记录 450 nm 处吸光度值。

1.2.8 平板克隆实验 将不同处理组细胞（ 8×10^2 个/孔）接种于 6 孔板中，于 37℃、5% CO₂ 条件下持续培养 2 周，4%甲醛室温固定 1 h，结晶紫染液染色 30 min 后 PBS 清洗，拍照。

1.2.9 划痕实验 将 ESCC 细胞（ 7×10^5 个/孔）接种于 6 孔板，融合度达到 100%后，用 200 μ L 无菌移液管尖在细胞层划线，PBS 清洗细胞碎片，更换为无血清培养基，分别于 0、24、48 h 对同一标记位置拍照。通过 Image J 软件统计划痕愈合变化。

1.2.10 Transwell 侵袭迁移实验 在 Transwell 小室基底膜上室铺稀释好的 Matrigel 凝胶放培养箱凝固后，上室加入不同处理组细胞（ 5×10^4 个/300 μ L）无血清悬液，下室加入 10%血清的 1640 培养基。培养 24～48 h 后，PBS 清洗 3 次、4%甲醇固定，并用结晶紫进行染色、拍照。Image J 计算通过微孔膜的下层细胞数。

1.2.11 统计学处理 用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 软件进行数据统计分析并绘图，两组间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，Pg 和 EGFR 表达的相关性分析采用 χ^2 检验， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Pg 感染促进 ESCC 中 EGFR 的表达上调 通过对单细胞测序结果进行组织偏好性分析（RO/E 指数），结果显示，Pg 阳性的肿瘤组织中主要富集上皮细胞（图 1A），随后对上皮细胞进行差异表达分析，显示 EGFR 在 Pg 阳性的上皮细胞中表达上调（图 1B），免疫组化结果显示，在 Pg 感染阳性（46.7%，21/45）的 ESCC 组织中 EGFR 的表达阳性率提高（80.9%，17/21），且 Pg 感染与 EGFR 的表达相关（ $P<0.01$ ）（图 1C 和表 2）。Western blot 检测 KYSE70 和 TE1 细胞感染 Pg 后 EGFR 的蛋白表达升高，RT-PCR 检测 EGFR mRNA 表达水平也显著升高（图 1D、1E）。此外，免疫荧光结果显示 Pg 感染后增强胞膜区 EGFR 的聚集（图 1F）。

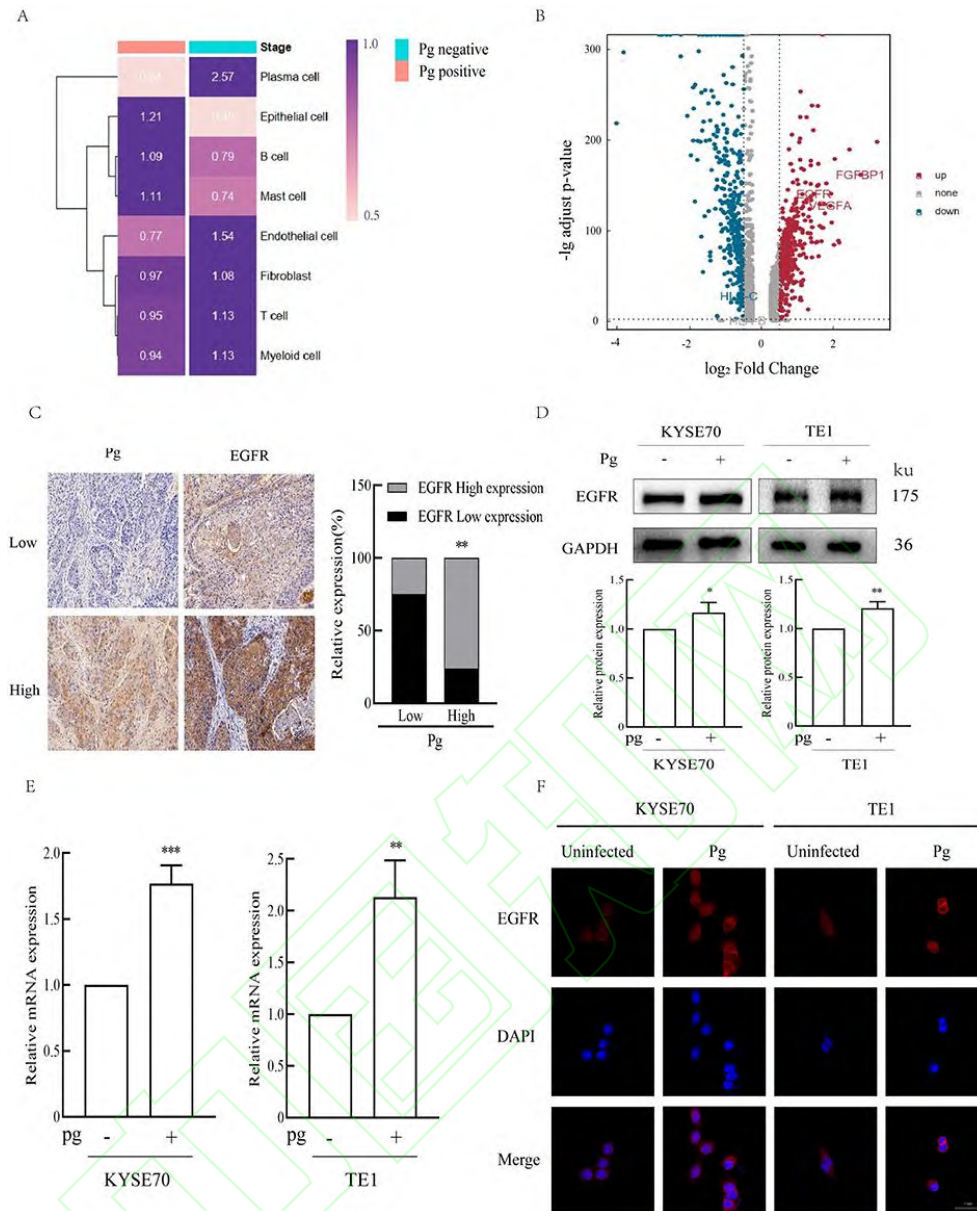


图 1 Pg 感染提高 EGFR 的表达水平

Fig. 1 The expression level of EGFR was significantly increased after Pg infection

A: RO/E index showed the organizational preference of subgroups; B: Volcano plot showed differential gene expression; C: IHC detection of Pg and EGFR expression $\times 200$; * $P < 0.01$ vs Pg Low group; D, E: Western blot and RT-PCR detection of EGFR expression with Pg infection; F: IF detection of the EGFR distribution with Pg infection $\times 400$; * $P < 0.05$, * $P < 0.01$, * * $P < 0.001$ vs Pg (-) group.

表 2 ESCC 组织中指标间的关系 [n (%)]

Tab. 2 Relationship among indicators in ESCC organization [n (%)]

Group	Pg		χ^2 value	P value
	(+)	(-)		
EGFR				
(+)	17 (37.8)	7 (15.5)	12.068	$P<0.01$
(-)	4 (8.9)	17 (37.8)		

2.2 EGFR 抑制剂 Ctx 对 ESCC 细胞的抑制作用 Pg 感染可以促使 ESCC 中 EGFR 的表达升高，为明确 Pg 通过 EGFR 调控 ESCC 的进展机制。因此，选取 EGFR 抑制剂西妥昔单抗（Ctx）来处理 ESCC 细胞，探明 Ctx 对 ESCC 细胞的作用。采用不同浓度的 Ctx 来处理 ESCC 细胞，CCK-8 结果显示，与对照组相比，Ctx 处理后可显著减缓细胞增殖（图 2A）。Western blot 检测不同浓度 Ctx 处理下对 ESCC 细胞 EGFR/P-EGFR 的影响。结果显示，在浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时，EGFR 及其磷酸化（P-EGFR）水平下降（图 2B、2C）。

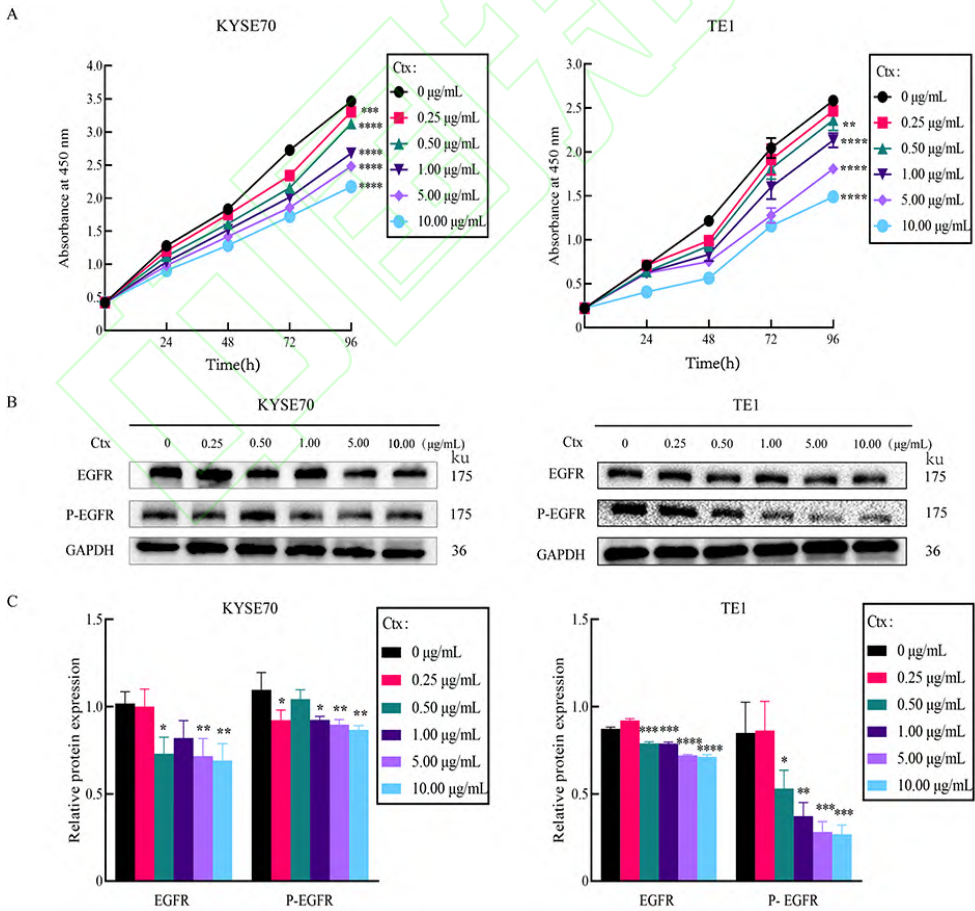


图 2 EGFR 抑制剂西妥昔单抗对 ESCC 细胞的作用

Fig. 2 The effects of EGFR inhibitor Ctx on ESCC cells

A: The results of detection by CCK-8; B,C: The expression of EGFR/P-EGFR detected by western blot; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Ctx 0 $\mu\text{g/mL}$ group.

2.3 Pg 促进 ESCC 细胞增殖、侵袭和迁移并增强对 Ctx 的抗性 用 Pg 和 Ctx (5 $\mu\text{g/mL}$) 来处理细胞, 采用 CCK-8、平板克隆、细胞划痕和 Transwell 实验, 分别检测 Pg 和 Ctx 对细胞的增殖和侵袭迁移能力的影响。结果显示 (图 3A-3D), Pg 感染后细胞的增殖和侵袭迁移能力显著增加, Ctx 抑制 EGFR 后, Pg 对细胞的影响作用下降, 说明 Pg 可通过 EGFR 促进 ESCC 细胞的增殖、侵袭和迁移。但与单纯 Ctx 处理组相比, Pg 感染也降低了 Ctx 抑制 ESCC 细胞的增殖、侵袭和迁移的能力, 由此可见, Pg 感染 ESCC 细胞后, 使其增强了对 Ctx 的耐药抵抗。

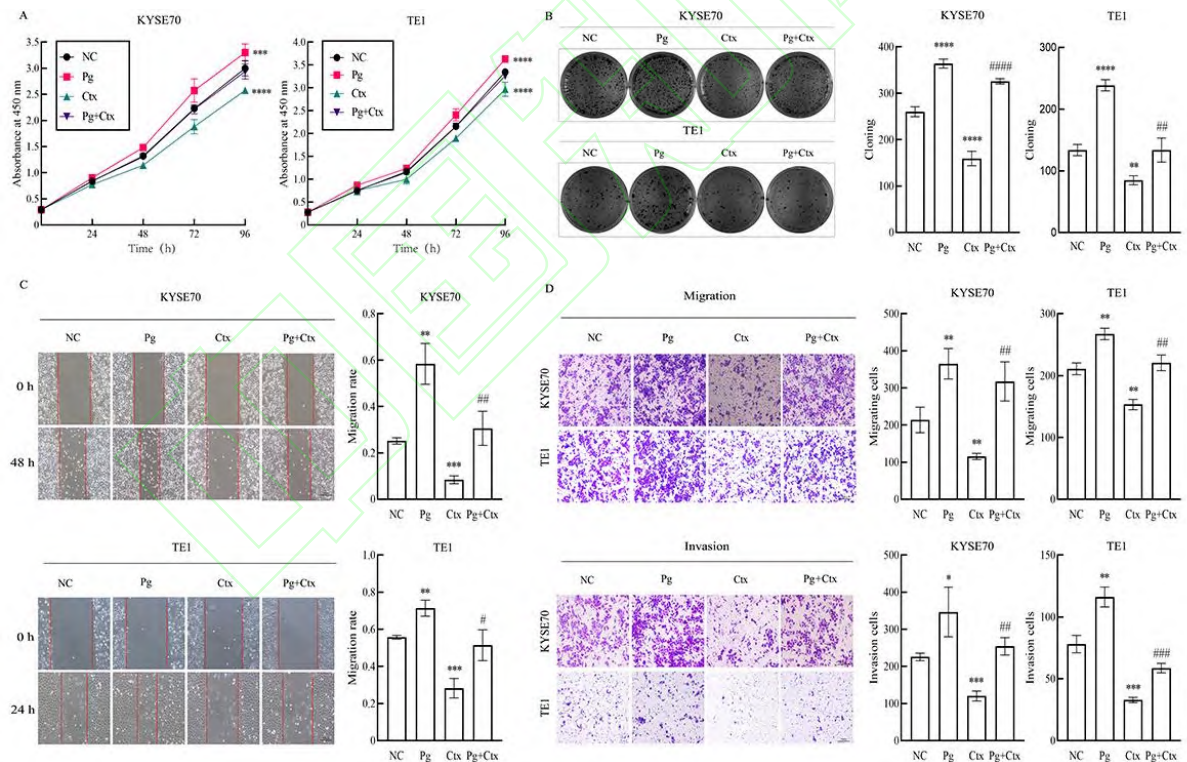


图 3 CCK-8、平板克隆、细胞划痕和 Transwell 实验检测 Pg 和 Ctx 对细胞的影响

Fig.3 The effects of Pg and Ctx on cells detected by CCK-8, plate cloning, wound healing and Transwell

A: The results of detection by CCK-8; B: The results of detection by plate cloning; C: The results of detection by wound healing; D: The results of detection by Transwell $\times 100$; *

$P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs Ctx group.

2.4 Pg 通过 EGFR/GSK3 β 信号轴诱导 EMT 增强 Ctx 耐药 EMT 被认为是多种癌症中细胞迁移、侵袭和耐药性的关键因素，因此，为阐明 ESCC 中 Pg 感染与 Ctx 耐药的机制，用 Pg 和 Ctx 处理 ESCC 细胞后，Western blot 检测 EMT 相关分子表达。结果显示（图 4A、4C），与对照组相比，Pg 处理后使 ESCC 细胞中 E-cadherin 蛋白表达降低，N-cadherin 和 Vimentin 表达升高，提示 Pg 可诱导 ESCC 细胞发生 EMT；与单纯 Ctx 处理组相比，Pg 与 Ctx 的作用相反，Pg 减弱了 Ctx 对 ESCC 细胞 EMT 现象的作用效果。由此可见，EMT 不仅和 EGFR 通路相关，而且 Pg 在 EMT 相关过程也起着关键作用。

在此基础上，又通过 Western blot 检测了 Pg 作用下 EGFR/GSK3 β 通路相关蛋白 EGFR、P-EGFR、PI3K、P-PI3K、AKT、P-AKT、GSK3 β 、P-GSK3 β 的表达情况。与预期结果一致，结果显示，Pg 处理后，ESCC 细胞中 EGFR/PI3K/AKT/GSK3 β 蛋白的磷酸化水平表达升高，而 GSK3 β 蛋白磷酸化后会抑制其自身酶活性，从而诱导 EMT 的发生；与单纯 Ctx 组比较，Pg 逆转了 EGFR/PI3K/AKT 蛋白的表达降低、GSK3 β 蛋白的表达升高，恢复了其磷酸化水平，增强了对 Ctx 抑制 EGFR 的信号级联反应的抗性作用（图 4B、4D）。以上结果提示，EGFR/GSK3 β 信号通路参与了 Pg 诱导的 EMT 过程，此过程是 Pg 增强 Ctx 耐药的关键。

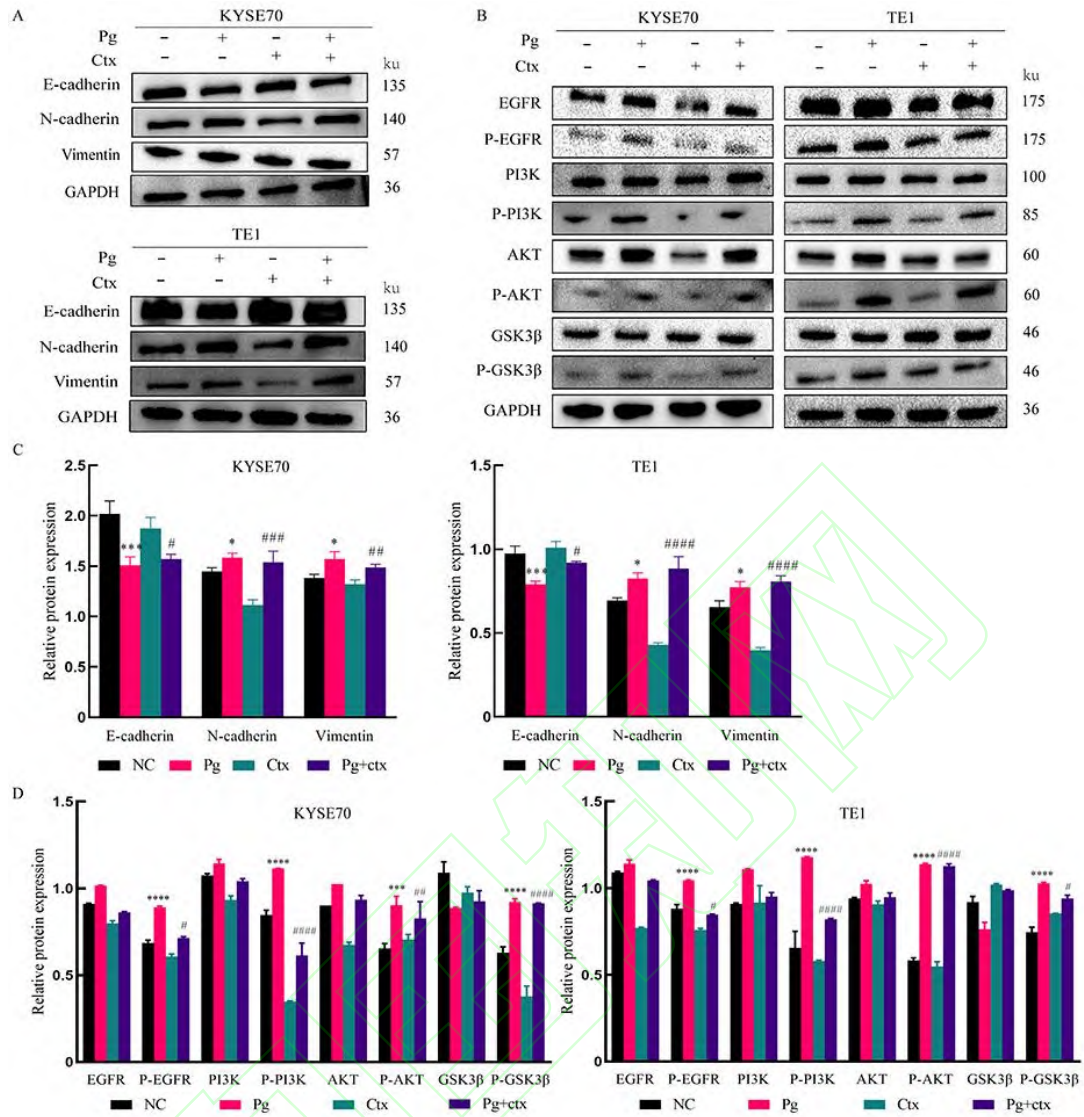


图4 Western blot 检测 EMT 和 EGFR/GSK3β 通路相关蛋白分子

Fig.4 EMT and EGFR/GSK3β pathway related protein molecule detected by Western blot

A, C: The expression of EMT related protein molecule detected by Western blot; B, D: The expression of EGFR/GSK3β related protein molecule detected by Western blot; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs Ctx group.

2.5 间充质样细胞显示出对 Ctx 的耐药抗性 为了进一步证实 EMT 可以增强对 Ctx 的耐药，首先用 TGF-β1 (5 ng/mL) 处理 ESCC 细胞诱导 EMT，使 ESCC 细胞由原来的上皮表型 (Epithelial phenotype) 转变间充质样表型 (Mesenchymal-like phenotype) (图 5A)：细

胞由紧密连接的椭圆形转变为疏松的梭形；Western blot 结果显示（图 5B），TGF- β 1 处理后其 E-cadherin 蛋白表达缺失，N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达升高表明间充质样表型诱导成功；CCK-8 实验表明 Ctx 可以抑制 ESCC 细胞的增殖，但对间充质样细胞作用不显著（图 5C）；细胞划痕和 Transwell 实验表明，ESCC 上皮细胞的迁移、侵袭能力受到 Ctx 抑制，而与加入 Ctx 的上皮细胞相比，间充质样细胞未受到 Ctx 的抑制效果（图 5D、5E）；Western blot 结果显示，与对照组相比，Ctx 可降低 ESCC 上皮细胞 EGFR 和其磷酸化的表达，与此相反，间充质样细胞 EGFR 的相关表达并未受到影响（图 5F）。

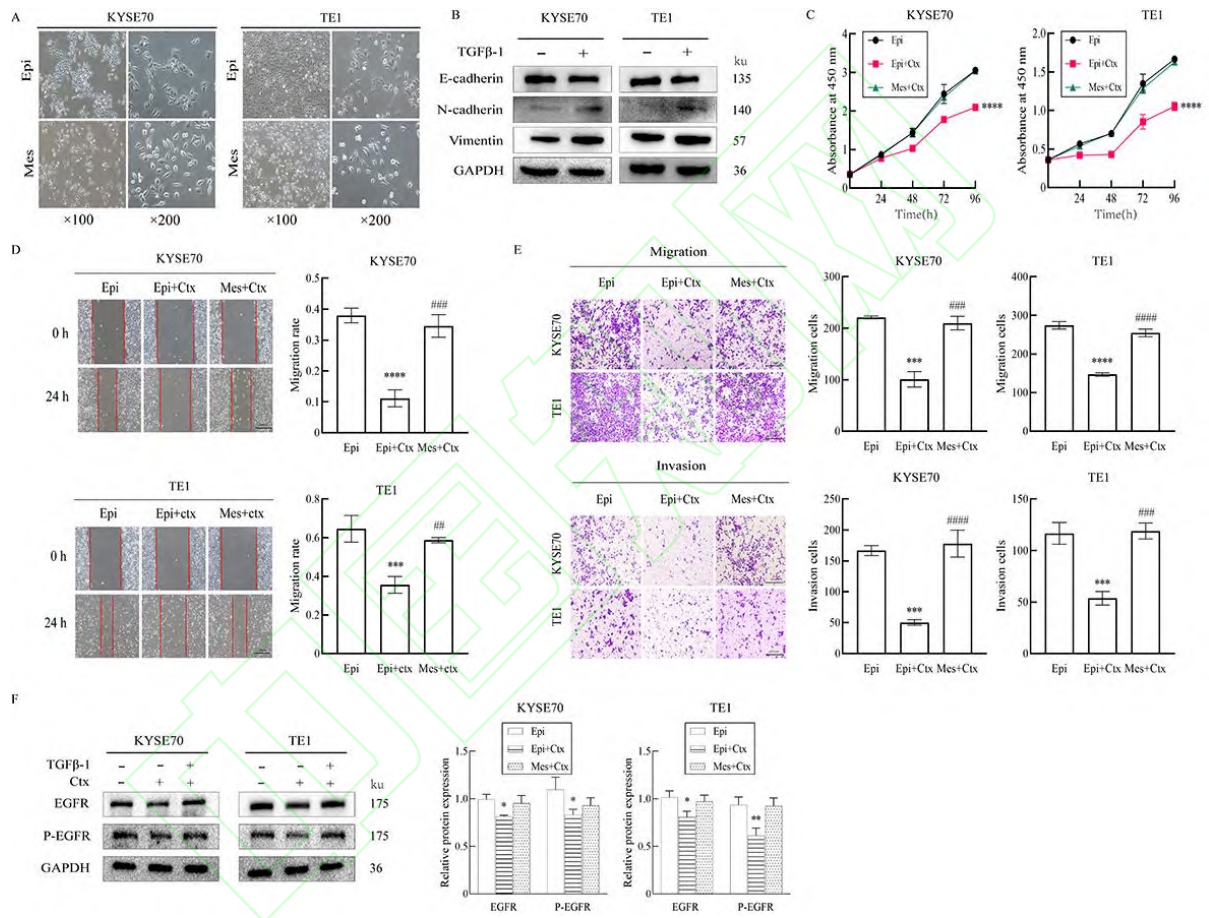


图 5 Ctx 对上皮细胞和间充质样细胞的不同作用

Fig. 5 Different effects of Ctx on epithelial cells and mesenchymal-like cells

A: Cell morphology after TGF- β 1 treatment; B: The expression of EMT related protein molecule detected by Western blot ; C: The results of detection by CCK-8; D: The results of detection by wound healing; E: The results of detection by Transwell $\times 100$; F: The expression of EGFR/P-EGFR detected by Western blot; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Epi group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs

Epi+Ctx group.

3 讨论

食管癌是全球第 8 大最常见的癌症，也是全球第 6 大癌症死亡原因^[8]。EC 在组织学上分为两类，腺癌（esophageal adenocarcinoma, EAC）和鳞状细胞癌（ESCC），而 ESCC 仍然是世界上最常见的食管癌类型^[9]。而食管与口腔紧邻，上皮均为鳞状上皮，不可避免成为口腔细菌的定植场所。上消化道的微生物生态失调是食管鳞状细胞癌的一个重要的风险因素，Pg 作为口腔重要致病菌，不仅对牙周健康造成巨大影响，还会促进食管鳞癌的生长和发展^[10]。此外，Pg 不仅与 ESCC 更差的预后相关，还能增强食管鳞癌的侵袭性，促进对新辅助化疗的耐药性^[11]。因此，明确 Pg 感染对 ESCC 恶性生物学行为发生的分子机制是十分必要的。

EGFR 作为一种酪氨酸激酶，通过 EGF 和 TGF 等多种配体来激活磷酸化反应，从而在正常的组织发育和功能中发挥着重要的作用。但当 EGFR 的表达或活性失控时，就会导致细胞增殖过度、抗凋亡、血管生成、侵袭和转移等癌症相关的现象。研究^[12]表明，EGFR 过表达与食管癌恶性表型有关，EGFR 参与了食管癌的发生，在肿瘤进展、预后等方面也有一定的作用。近年来，EGFR 作为靶向药物广泛应用于多种癌症，虽然靶向 EGFR 的治疗在临床试验中显示疗效，但耐药问题突出。本研究表明，Pg 感染阳性的 ESCC 组织中 EGFR 表达上调，而且 Pg 感染可以促进 ESCC 细胞中 EGFR 的表达。此外，Pg 感染明显增强了 ESCC 细胞的增殖和侵袭迁移能力，与之相反，Ctx 的干预抑制了 ESCC 细胞的增殖、侵袭和迁移。但 Pg 的存在，降低了 Ctx 对 ESCC 细胞的抑制作用，可见，Pg 可通过一些方式增加了 ESCC 细胞对 Ctx 耐药抵抗。关于肿瘤耐药，大多数研究集中于基因突变或旁路激活，而对微生物介导的耐药机制关注不足。研究^[13]表明 EMT 不仅在上皮细胞性肿瘤侵袭和转移过程中均起到关键作用，而且在化疗或放疗耐药的肿瘤组织和细胞中也发现了不同的 EMT 过程，这表明 EMT 与肿瘤恶性进展和耐药有内在联系^[14-15]。有研究^[16]表明，长期反复的 Pg 感染可诱导 EMT 并增强口腔鳞癌对紫杉醇的耐药性。本研究中，单细胞测序结果显示，Pg 感染不仅上调 EGFR，而且 Wnt 通路也被激活，提示 Pg 可能激活下游通路促进 EMT 驱动。随后检测了 Pg 处理 ESCC 细胞后 EGFR/GSK3 β 信号通路和 EMT 相关分子的表达，结果显示，Pg 感染激活了 EGFR/PI3K-AKT 通路，使下游分子 GSK3 β 磷酸化失活，从而诱导 ESCC 细胞发生 EMT。Pg 不仅减弱了 Ctx 抑制 EGFR 后的信号级联反应，而且通过诱导 EMT 使 ESCC 细胞对 Ctx 耐药。为了进一步证实 Pg 导致的 EMT 与 Ctx 耐药

相关,本研究又通过 TGF- β 1 诱导 ESCC 细胞产生 EMT,使作为上皮表型的 ESCC 细胞转变为间充质样表型,结果显示,Ctx 并不能降低间充质样细胞 P-EGFR 的表达,相比于上皮细胞,对间充质样细胞没有明显的抑制作用。Yoshioka et al^[17]研究表明,表型异质性可能是影响 EGFR 抑制剂疗效的关键因素,这一观点与本研究的结果保持一致。本研究从细胞层面探讨了 Pg 感染对 ESCC 恶性进展的调控机制,初步表明 Pg 可诱导 ESCC 细胞发生 EMT 引起表型转变,从而促进 ESCC 细胞的增殖、侵袭迁移以及对 Ctx 耐药。而 Pg 通过其他机制(比如旁路信号激活、免疫调控等)引起 ESCC 的进展和耐药,则需要更深层的研究。

综上所述, Pg 可通过 EGFR/GSK3 β 信号通路诱导 ESCC 细胞发生 EMT,促进 ESCC 的恶性进展的同时增强了对 Ctx 的耐药。Pg 对 ESCC 的防治及药物疗效具有重大意义,可能是克服耐药性的重要因素,也有望为 EGFR 抑制剂对 ESCC 的临床治疗提供新见解。

参考文献

- [1] Rogers J E, Sewastjanow-Silva M, Waters R E, et al. Esophageal cancer: emerging therapeutics[J]. Expert Opin Ther Targets, 2022, 26(2): 107-17. doi:10.1080/14728222.2022.2036718.
- [2] Lamont R J, Fitzsimonds Z R, Wang H, et al. Role of *Porphyromonas gingivalis* in oral and orodigestive squamous cell carcinoma[J]. Periodontol 2000, 2022, 89(1): 154-65. doi:10.1111/prd.12425.
- [3] Gao S G, Yang J Q, Ma Z K, et al. Preoperative serum immunoglobulin G and A antibodies to *Porphyromonas gingivalis* are potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 17. doi:10.1186/s12885-017-3905-1.
- [4] Chakravarthy K K, Pavithra V, Joseph L D, et al. Overexpression of EGFR in esophageal squamous cell carcinomas - A new biological target in cancer therapy[J]. J Cancer Res Ther, 2023, 19(Suppl 2): S461-5. doi:10.4103/jcrt.jcrt_933_22.
- [5] Chen Y, Xu H, Yu P, et al. Interferon- γ inducible protein 30 promotes the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype and chemoresistance by activating EGFR/AKT/GSK3 β / β -catenin pathway in glioma[J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(12): 4124-38. doi:10.1111/cns.14334.
- [6] Fontana R, Mestre-Farrera A, Yang J. Update on epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression[J]. Annu Rev Pathol, 2024, 19: 133-56. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-051222-122423.
- [7] Gao S, Li S, Ma Z, et al. Presence of *Porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer[J]. Infect Agent Cancer, 2016, 11: 3. doi:10.1186/s13027-016-0049-x.
- [8] Liu C Q, Ma Y L, Qin Q, et al. Epidemiology of esophageal cancer in 2020 and projections to 2030 and 2040[J]. Thorac Cancer, 2023, 14(1): 3-11. doi:10.1111/1759-7714.14745.
- [9] Waters J K, Reznik S I. Update on management of squamous cell esophageal cancer[J]. Curr

- Oncol Rep, 2022, 24(3): 375-85. doi:10.1007/s11912-021-01153-4.
- [10] Chen M F, Lu M S, Hsieh C C, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cell Oncol, 2021, 44(2): 373-84. doi:10.1007/s13402-020-00573-x.
- [11] 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.
- [12] Wang B, Li M, Su A, et al. Prognostic value of GPNMB, EGFR, p-PI3K, and ki-67 in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Anal Cell Pathol, 2022, 2022: 9303081. doi:10.1155/2022/9303081.
- [13] Dongre A, Weinberg R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(2): 69-84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4.
- [14] Zhou J, Wang X, Li Z, et al. PIM1 kinase promotes EMT-associated osimertinib resistance via regulating GSK3 β signaling pathway in EGFR-mutant non-small cell lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(9): 644. doi:10.1038/s41419-024-07039-0.
- [15] Luo M, Wu C, Guo E, et al. FOXO3a knockdown promotes radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition and the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2019, 455: 26-35. doi:10.1016/j.canlet.2019.04.019.
- [16] Woo B H, Kim D J, Choi J I, et al. Oral cancer cells sustainedly infected with *Porphyromonas gingivalis* exhibit resistance to Taxol and have higher metastatic potential[J]. Oncotarget, 2017, 8(29): 46981-92. doi:10.18632/oncotarget.16550.
- [17] Yoshioka M, Ohashi S, Ida T, et al. Distinct effects of EGFR inhibitors on epithelial- and mesenchymal-like esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 101. doi:10.1186/s13046-017-0572-7.