



牙龈卟啉单胞菌诱导口腔鳞状细胞癌免疫抑制微环境形成的机制研究*

张一博¹, 许立明¹, 乃吉拜·莫敏¹, 李娇阳¹, 凌彬^{1,2,Δ}

1. 新疆医科大学第一附属医院/附属口腔医院 口腔颌面肿瘤外科(乌鲁木齐 830054);
2. 新疆维吾尔自治区口腔医学研究所(乌鲁木齐 830054)

【摘要】目的 探讨牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, P.g)在口腔鳞状细胞癌肿瘤微环境中的作用,从而为口腔鳞状细胞癌的治疗提供新的思路。**方法** 体外培养鼠源性鳞状细胞癌细胞系SCC7,构建C57BL/6小鼠荷瘤模型。实验小鼠按照随机对照原则分为P.g激活组与对照组,每组各5只,饲养16 d以后处死,记录两组小鼠瘤体质量与体积。采用免疫组织化学技术分析瘤体组织中CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)、白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)、干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、Twist、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、CD31、Ki67表达水平。使用流式细胞术对两组实验小鼠的肿瘤样本进行检测,量化分析样本中的CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞以及CD69⁺、CD103⁺ T淋巴细胞的比例差异。**结果** 免疫组化结果显示,激活组小鼠瘤体组织中CD4⁺ T细胞及其功能相关细胞因子与对照组相比表达较高,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。流式细胞术结果表明,激活组小鼠瘤体组织内CD8⁺ T细胞所占比例下降,且发挥抗肿瘤免疫作用的CD103⁺CD8⁺ T细胞比例下降,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。此外,激活组肿瘤恶性表型相关细胞因子表达均升高,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** P.g通过增强口腔鳞状细胞癌肿瘤微环境CD4⁺ T细胞浸润并且抑制CD8⁺ T细胞的免疫抑制功能,致使肿瘤细胞免疫逃逸,加速了肿瘤细胞上皮-间充质转化现象、成血管现象以及肿瘤细胞增殖。

【关键词】 口腔鳞状细胞癌 牙龈卟啉单胞菌 免疫抑制微环境 肿瘤恶性生物学行为

Mechanism of *Porphyromonas gingivalis* Inducing the Formation of a Local Immunosuppressive Microenvironment in Oral Squamous Cell Carcinoma

ZHANG Yibo¹, XU Liming¹, NAIJIBAI·MOMIN¹, LI Jiaoyang¹, LING Bin^{1,2,Δ}. 1. Department of Oral and Maxillofacial Oncology & Surgery, The First Affiliated Hospital/Hospital of Stomatology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Stomatological Research Institute of Xinjiang Autonomous Region, Urumqi 830054, China

Δ Corresponding author, E-mail: 34527623@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the role of *Porphyromonas gingivalis* (P.g) in the tumor microenvironment of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and provide new insights for OSCC treatment. **Methods** The murine squamous cell carcinoma cell line SCC7 was cultured *in vitro*, and a tumor-bearing model was established with C57BL/6 mice. Experimental mice were randomly assigned to the P.g activation group and the control group ($n = 5$ per group) based on the principles of randomization and control. After 16 days of feeding, the mice were sacrificed, and the weight and volume of the tumors in the two groups of mice were recorded. Immunohistochemistry was performed to analyze the expression levels of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, transforming growth factor-β (TGF-β), interleukin-10 (IL-10), interferon-γ (IFN-γ), E-cadherin, N-cadherin, Twist, vascular endothelial growth factor (VEGF), CD31, and Ki67 in the tumor tissues. Flow cytometry was performed to examine the tumor samples from the two groups of mice, and to quantify the proportional differences of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, as well as CD69⁺ and CD103⁺ on T lymphocytes from the samples. **Results** The immunohistochemistry results showed that the expression of CD4⁺ T cells and their function-related cytokines in the tumor tissues of the activation group was higher than that of the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). According to the flow cytometry results, the proportion of CD8⁺ T cells in the tumor tissues of the activation group decreased, and the proportion of CD103⁺CD8⁺ T cells, which played an anti-tumor immune role, also decreased, with the differences being statistically significant compared with the control group ($P < 0.05$). In addition, the

* 国家自然科学基金(No. 82460524)和新疆维吾尔自治区自然科学基金-杰出青年科学基金(No. 2022D01E073)资助

Δ 通信作者, E-mail: 34527623@qq.com

出版日期: 2025-05-20

expression of all the cytokines associated with malignant tumor phenotypes in the activation group increased, and the differences were statistically significant compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** This study verified through animal experiments that by enhancing the infiltration of $CD4^+$ T cells and suppressing the immunosuppressive function of $CD8^+$ T cells in the OSCC tumor microenvironment, *P.g* enables tumor cell immune escape and accelerates epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis, and tumor cell proliferation.

[Key words] Oral squamous cell carcinoma *Porphyromonas gingivalis* Immunosuppressive microenvironment Malignant biological behavior of tumors

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是头颈部常见的恶性肿瘤,主要发生于口腔黏膜,会严重影响容貌和导致口腔功能障碍,包括吞咽、言语和味觉障碍,显著降低患者生活质量^[1]。目前,手术是大多数OSCC患者的首选治疗方法,通常还会辅以放疗、化疗或免疫治疗。但过去几十年来,OSCC的预后并没有明显改善,复发率仍然很高,五年生存率仍然较低^[2]。因此,迫切需要探索OSCC患者的新诊疗思路和治疗靶点^[3]。

肿瘤细胞与其周围的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及基质细胞之间存在着紧密的相互作用,这种互动共同塑造了复杂的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)。TME中不仅包含多种免疫和非免疫类型细胞,还包括这些细胞释放出的多种因子,共同构建了慢性炎症、免疫抑制以及促血管生成的肿瘤微环境^[4]。其中,T淋巴细胞在调控肿瘤生长和进展中发挥关键作用。大量证据表明 $CD8^+$ T细胞是抗肿瘤免疫的重要组成部分^[5]。高表达的肿瘤抗原可激活 $CD8^+$ T细胞的抗肿瘤反应;反之, $CD8^+$ T细胞的耗竭可能促进癌细胞增殖,这也进一步说明了其在抑制癌症进展中的关键作用^[6]。相比之下, $CD4^+$ T细胞的表达情况和OSCC的不良预后之间存在更密切的相关性。研究表明,特定于肿瘤部位的抗原特异性 $CD4^+$ T细胞能够显著削弱免疫反应,从而导致肿瘤细胞的免疫逃逸^[7]。

肿瘤细胞的恶性生物学行为仍然是口腔鳞状细胞癌患者治疗失败和死亡的主要原因,包括肿瘤细胞的增殖、上皮-间充质转化现象以及血管生成现象等。上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞失去极化并获得间充质表型的过程,通常由EMT相关标志物的变化来定义^[8]。EMT与肿瘤的发生、侵袭、转移、抗药性和复发有关^[9]。EMT诱导的肿瘤表型变化会阻碍OSCC中 $CD8^+$ T细胞发挥抗炎作用,降低机体对抗肿瘤免疫反应,致使肿瘤细胞免疫逃逸及造成患者预后不良^[10-12]。

牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.g*),曾被称为牙龈杆菌,主要与牙周病的发病和进展相关^[13]。*P.g*与人类的许多慢性系统性疾病相关,如炎症性肠病、

心血管疾病、阿尔茨海默病、糖尿病以及类风湿性关节炎等^[14]。此外,研究还发现胃肠道癌症与*P.g*有关,例如,*P.g*感染可诱导食管鳞状细胞癌和胃癌的侵袭性进展^[15]。研究表明,*P.g*可通过直接代谢化学致癌物质和产生一般炎症效应在OSCC中发挥重要作用,从而增加患者的死亡风险^[15]。

本课题组前期通过体外实验证明了*P.g*能增强OSCC细胞的增殖、迁移及侵袭能力,并通过生物信息学分析筛选出趋化因子CCL20^[16]。研究表明,其可与下游CCR6受体结合,诱导Treg细胞(调节性T细胞)分化,分泌转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)等负性调节因子,抑制常规T细胞的免疫功能,介导肿瘤局部和系统性 $CD8^+$ T细胞免疫耗竭,降低其效应和杀伤能力,促进肿瘤细胞免疫逃逸和侵袭转移。因此,在本研究中,我们利用小鼠体内实验验证*P.gingivalis*感染OSCC肿瘤微环境时,会对肿瘤微环境中 $CD4^+$ T细胞、 $CD8^+$ T细胞的比例及功能产生不同的影响,从而导致肿瘤细胞免疫逃逸,促进OSCC的进展及肿瘤恶性生物学行为。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂

*P.g*菌株W83(编号BNCC353909,源自中国北京北纳创联生物技术研发机构);鼠源性鳞状细胞癌细胞系SCC7购自上海富衡生物科技有限公司;主要抗体包括E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、血管内皮生长因子(VEGF)、血小板内皮细胞黏附分子-1(CD31)及增殖细胞核抗原(Ki-67),配套二抗均由中国北京博奥森公司提供;DAB显色试剂、封闭山羊血清(北京中杉金桥生物科技有限公司,中国);实验所用胎牛血清购自乌拉圭EXCELL公司。实验动物C57BL/6品系小鼠由新疆医科大学动物实验中心提供;本研究经新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审查批准(20220309-131)。

1.2 实验方法

1.2.1 SCC7细胞的培养

从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出1 mL冻存细胞,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴

中轻轻晃动,解冻以后,将5 mL完全培养基加入其中,将其混合均匀。置于离心机中进行离心处理,转速为1 000 r/min,时长5 min,弃上层清液,同时添加4~6 mL完全培养基,将完全培养基和细胞沉淀吹打混合均匀。将全部细胞悬液分装于T25培养瓶中,随后将培养瓶置于设定为CO₂浓度为5%和温度37 ℃的恒温孵化器内静置一夜。次日换液,观察细胞的贴壁状况,同时估算细胞的浓度。若细胞浓度超过80%,则标志着细胞符合传代的条件。

1.2.2 *P.g*的培养

本实验采用的是*P.g*菌株W83标准菌株,使用哥伦比亚型液态培养基和琼脂固化培养基培养。在无菌操作台中,将待测菌接种至涂有血液的哥伦比亚琼脂平面上。将此接种后的平板与厌氧气体的发生包共同置于厌氧培养舱内,并在37 ℃的稳定环境中进行培养。

1.2.3 C57BL/6小鼠荷瘤实验

使用C57BL/6品系野生小鼠构建荷瘤模型,遵循随机对照的实验原则,将10只野生小鼠分为两组:一组作为对照组(接种SCC7细胞),另一组作为激活组(接种SCC7细胞+*P.g*)。配制的细胞悬液为:2×10⁶个细胞,菌液浓度为1×10⁹ CFU/mL。在实验小鼠腹腔注入适量麻醉剂,激活组小鼠麻醉后,向右侧颊黏膜注射400 μL *P.g*菌与细胞的混合悬液;在对照组小鼠被麻醉以后,注射400 μL细胞的悬液。在16 d后,两组实验小鼠均被处死,摘取肿瘤组织并采集血液样本。通过测量肿瘤的长轴长度*a*(mm)和短轴长度*b*(mm),依据公式 $V=1/2 \times a \times b^2$ 来计算肿瘤体积。

1.2.4 小鼠肿瘤标本的免疫组化实验

首先,对小鼠的肿瘤组织执行标准的脱蜡步骤及抗原修复程序,随后在4 ℃恒温条件下进行一抗过夜孵育。其中,一抗的稀释比例具体为:E-Cadherin(1:400)、N-Cadherin(1:400)、Twist(1:200)、CD4(1:800)、CD8(1:1 000)、VEGF(1:500)、CD31(1:500)、Ki67(1:400)。次日,向样本中滴加二抗,随后行DAB显色反应和苏木素复染步骤,再进行脱水及中性树脂封片处理。利用光学显微镜观察SCC7细胞的染色情况,选取200倍放大倍数下的5个不同观察区域。采用Image-Pro Plus 6.0软件进行精确分析,测定图片的累积光密度值(IOD)并计算阳性区域的面积。

1.2.5 流式细胞术

两组小鼠瘤体组织CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞亚群以及CD69⁺、CD103⁺在CD4⁺T细胞及CD8⁺T细胞中表达的测定。为了获取肿瘤组织的细胞悬液,将样本放置于200目的不锈钢网上进行研磨,随后利用含有0.2%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(PBS)收集研磨后的液体。

2 000 r/min离心处理5 min,移除细胞悬液中的上清部分。使用淋巴细胞分离液进行了梯度离心,进一步去除上清液后,加入红细胞裂解液使细胞重悬并沉淀。之后,将细胞转移至新的离心管中,置于冰上且避光的环境下进行红细胞裂解。裂解完成后,使用含有0.2%BSA的PBS溶液对细胞进行洗涤并重悬后,在显微镜下对淋巴细胞进行计数。从两组小鼠的肿瘤组织中分别提取1×10⁶个淋巴细胞,并使用α-CD16/32封闭液使细胞重悬。在4 ℃的条件下孵育30 min后,分别向细胞悬液中加入CD4、CD8、CD69和CD103的特异性抗体,并在4 ℃且避光的环境下继续孵育30 min。随后使用300 μL的PBS对细胞进行洗涤,重悬后进行过滤处理。最后利用流式细胞仪对CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞以及CD69⁺、CD103⁺的表达水平进行了检测,观察其在两组小鼠肿瘤组织中的数量变化情况。

1.3 统计学方法

采用SPSS 27.0版本进行数据统计分析,其中计量数据通过平均值与标准差的形式呈现。组间差异采用*t*检验和单因素方差分析来进行评估,并运用SNK方法进一步比较平均值。*P*<0.05为差异有统计学意义。同时使用GraphPad Prism 8.0软件来绘制图表,借助Image-Pro Plus 6.0工具来分析图像的光密度值。

2 结果

2.1 *P.g*在小鼠模型中促进OSCC进展

实验过程中激活组与对照组小鼠体质量差异均无统计学意义(*P*>0.05)(图1A)。注射16 d后,激活组与对照组瘤体重量及体积差异均具有统计学意义(*P*<0.001)(图1B和图1C),激活组小鼠体积和质量均大于对照组。两组小鼠瘤体组织HE染色结果见图1D。

2.2 对比两组小鼠瘤体组织内CD4⁺T及CD8⁺T细胞的表达水平

免疫组织化学的检测结果显示,激活组小鼠瘤体组织中CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞阳性面积较对照组有明显变化。CD4⁺T细胞阳性面积比例升高(*P*<0.01)(图2A),而CD8⁺T细胞阳性面积比例降低(*P*<0.05)(图2B)。流式细胞术结果显示,激活组小鼠瘤体组织中CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞比例发生变化,与对照组相比,激活组CD4⁺T细胞比例上升(*P*<0.001);CD8⁺T细胞比例有所下降(*P*<0.05)(图2C),且差异均具有统计学意义。

2.3 两组小鼠瘤体组织内CD69⁺、CD103⁺CD4⁺T细胞及CD69⁺、CD103⁺CD8⁺T细胞的表达水平

流式细胞术结果显示,CD69⁺CD4⁺T细胞、CD69⁺

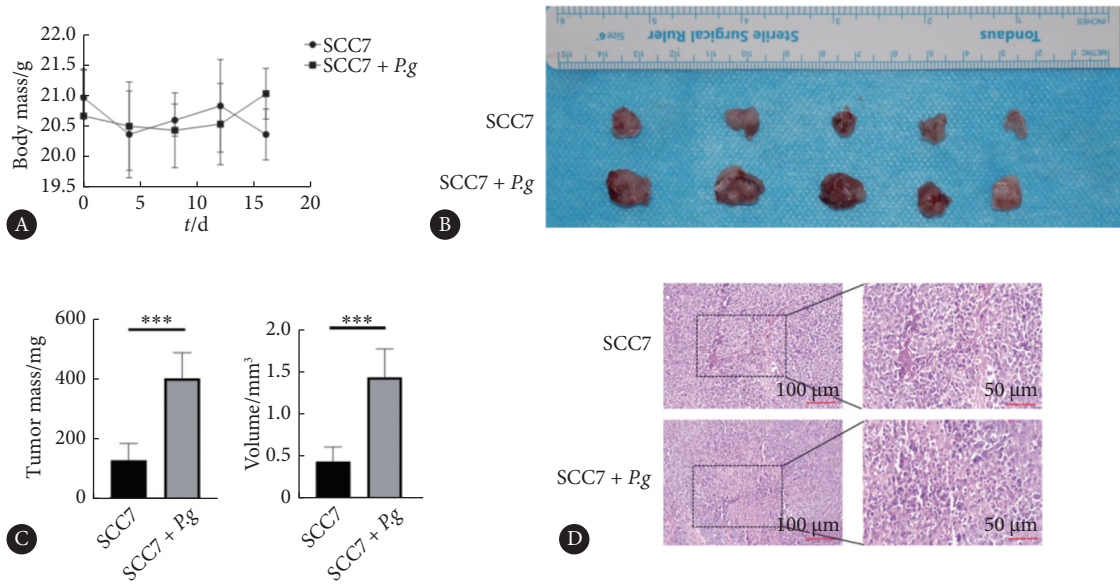


图 1 两组小鼠实验过程中体质量曲线 (A)、实验结束时瘤体体积和质量 (B、C) 以及 HE 染色结果 (D)

Fig 1 Body weight curves of two groups of mice (A), changes in tumor tissue (B and C), and HE staining results (D)

P.g. Porphyromonas gingivalis. *** $P < 0.001$, $n = 5$.

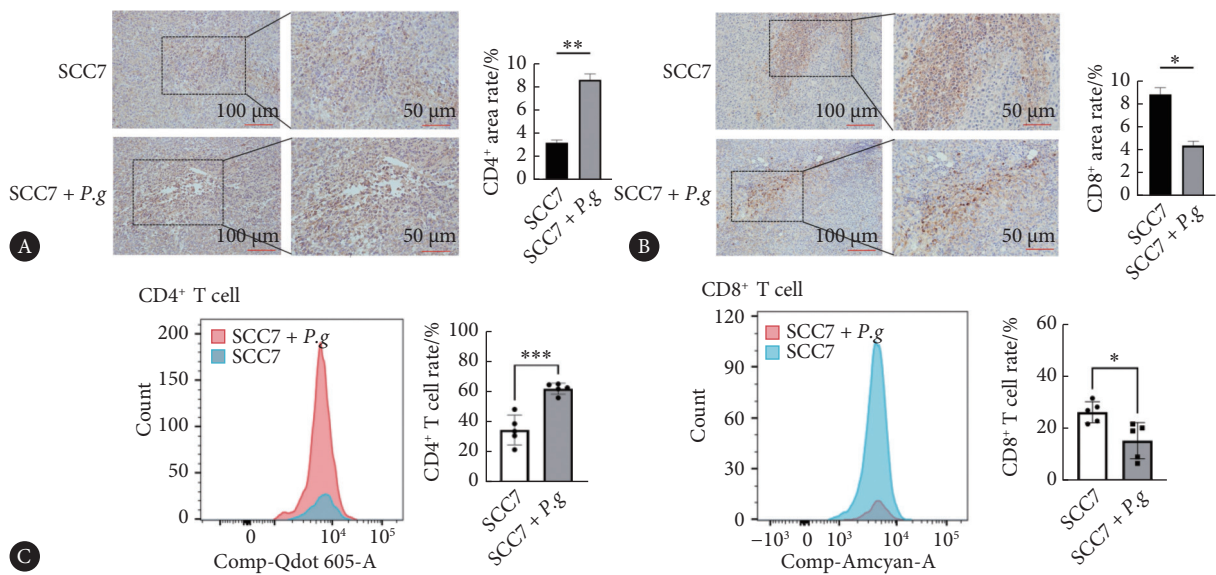


图 2 免疫组化显示 CD4⁺ T 细胞 (A) 及 CD8⁺ T 细胞 (B) 在小鼠瘤体组织中的表达及流式细胞术检测 CD4⁺ T 细胞及 CD8⁺ T 细胞所占比例 (C)

Fig 2 Immunohistochemistry reveals the expression of CD4⁺ T cells (A) and CD8⁺ T cells (B) in the tumor tissues of mice, and flow cytometry determines the proportions of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells (C)

P.g. Porphyromonas gingivalis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 5$.

CD8⁺ T 细胞比例均有所升高 ($P < 0.001$)。而对于 CD103⁺而言, 激活组小鼠瘤体组织 CD103⁺CD8⁺ T 细胞比例降低, CD103⁺CD4⁺ T 细胞比例升高 ($P < 0.001$) (图 3)。

2.4 IFN-γ、TGF-β、IL-10 在各组小鼠肿瘤组织中的表达情况

免疫组织化学结果显示, 激活组小鼠瘤体组织中 Treg 细胞分泌的 TGF-β、IL-10 与对照组相比有所升高, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。而激活组中 CD8⁺ T 细胞

所分泌的 IFN-γ 表达明显降低 ($P < 0.01$) (图 4)。

2.5 E-cadherin、N-cadherin、Twist、VEGF、CD31、Ki67 在各组小鼠肿瘤组织中的表达

免疫组织化学结果显示, 激活组小鼠瘤体组织中 N-cadherin、Twist、VEGF、CD31、Ki67 细胞阳性面积比例升高, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 激活组小鼠瘤体组织中 E-cadherin 表达降低 ($P < 0.05$) (图 5)。

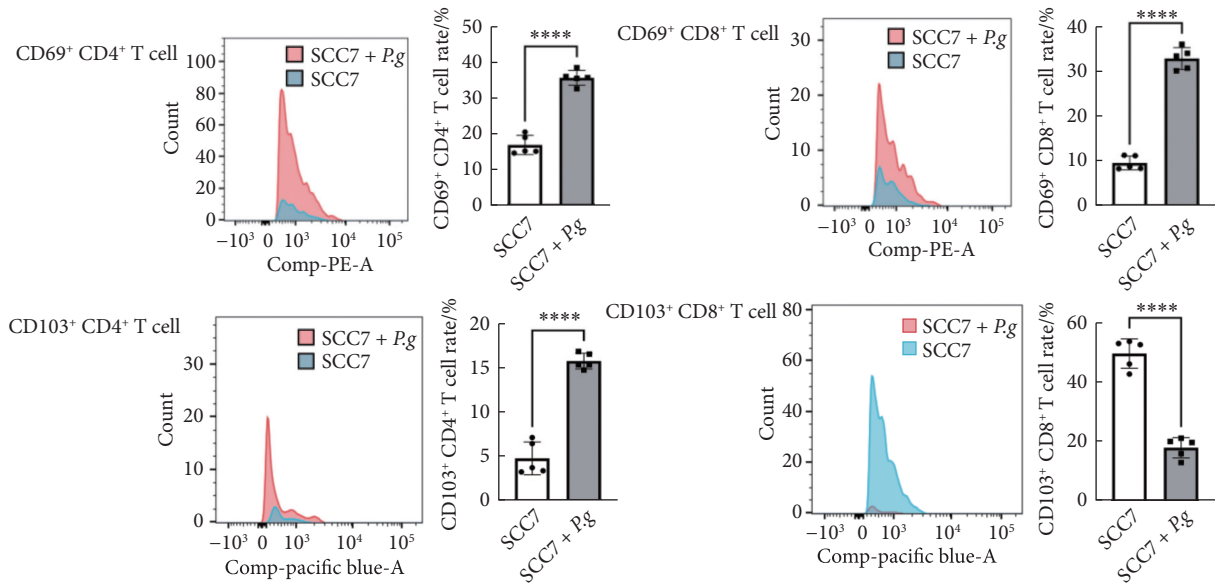


图 3 流式细胞术显示CD69⁺、CD103⁺在CD4⁺ T细胞及CD8⁺ T细胞中表达水平

Fig 3 Flow cytometry shows the expression level of CD69⁺ and CD103⁺ in CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells

P.g. Porphyromonas gingivalis. **** $P < 0.0001$. $n = 5$.

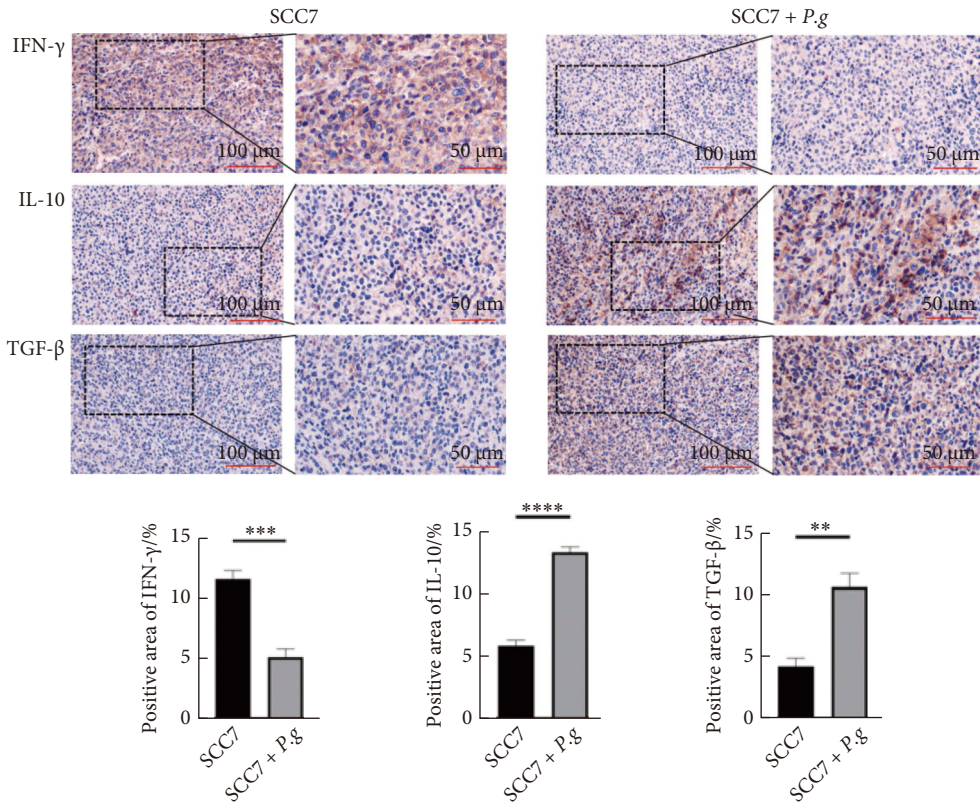


图 4 CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞功能相关调节因子在各组小鼠肿瘤组织中的表达

Fig 4 Expression of function related regulatory factors of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in tumor tissues of each group of mice

P.g. Porphyromonas gingivalis; TGF-β: transforming growth factor-β; IL-10: interleukin-10; IFN-γ: interferon-γ. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. $n = 5$.

3 讨论

肿瘤微环境(TME)即肿瘤细胞周围的基质细胞、免

疫细胞、淋巴管等成分^[17], TME影响肿瘤的生长、转移扩散和预后效果^[18-19]。越来越多的研究证据表明, OSCC的发生不仅受遗传和表观遗传改变的影响, 也受TME中不

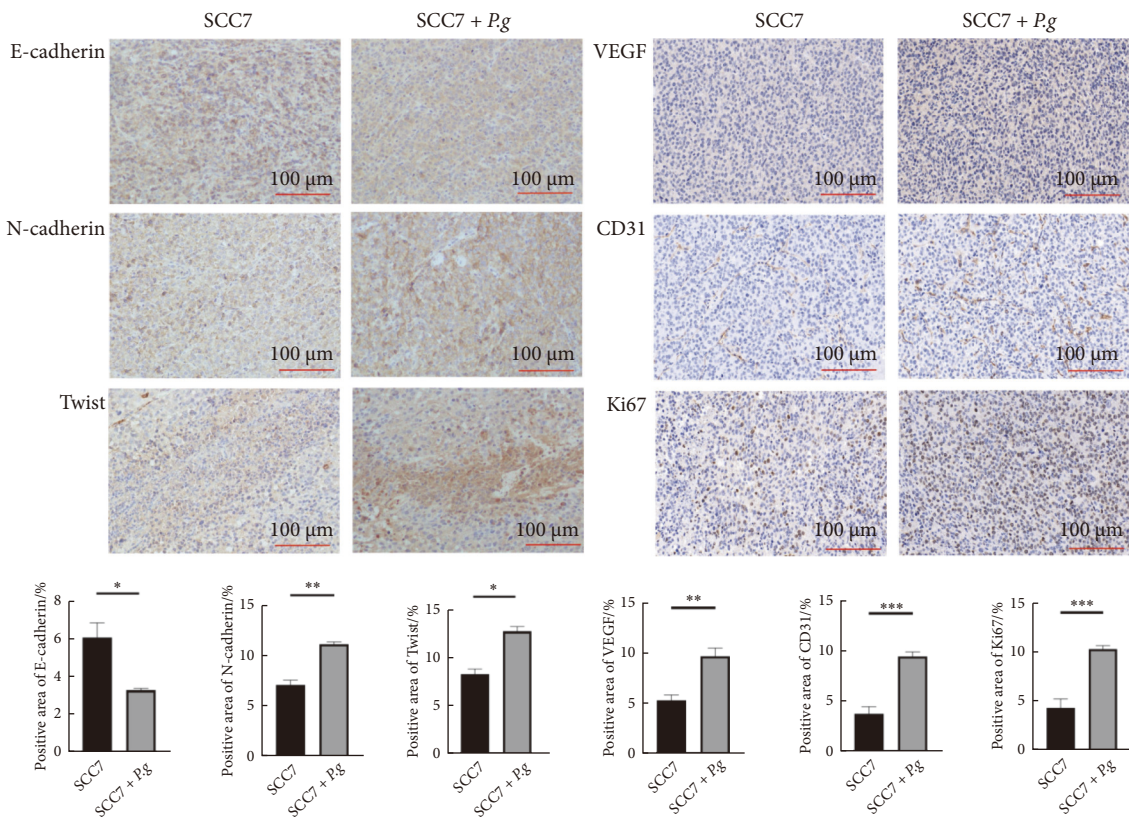


图5 EMT相关标志物、血管生成标志物以及细胞增殖标志物Ki67在两组小鼠瘤体组织中表达情况

Fig 5 Expression of EMT-related markers, angiogenesis markers, and cell proliferation marker Ki67 in tumor tissues of the two groups of mice

P.g.: *Porphyromonas gingivalis*; VEGF: vascular endothelial growth factor. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $n = 5$.

同组分间的复杂关系的影响^[7]。

口腔微生物群在OSCC发生发展方面起着关键作用。*P.g.*是牙周病的主要病原体,被认为是肿瘤进展的独立微生物^[20]。研究表明,*P.g.*等口腔微生物群主要通过诱导慢性炎症破坏局部免疫反应,导致肿瘤细胞的免疫逃逸,在促进OSCC的进展方面发挥着重要作用^[21-22]。WEN等^[6]研究表明,*P.g.*在肿瘤中的定植与OSCC患者的总生存率呈负相关。此外,已有大量体外研究揭示了*P.g.*在促进OSCC进展方面的作用,包括促进肿瘤细胞增殖和侵袭等^[23]。然而,*P.g.*如何通过调控肿瘤微环境导致肿瘤细胞免疫逃逸的机制尚不明确。本研究通过建立小鼠OSCC荷瘤模型,分别设立*P.g.*激活组及对照组,结果显示,两组小鼠瘤体组织质量及体积有显著差异,这表明*P.g.*可促进OSCC的发生发展。

免疫细胞在OSCC的形成与发展过程中可能展现出不同的功能。在细胞因子的调控下,CD4⁺T细胞能分化成包括Th1、Th2、Th17及Treg在内的多种亚群。其中, Th17细胞通过释放IL-17和IL-21来促进炎症反应,而Treg细胞则产生IL-10和TGF- β ,对肿瘤细胞、细胞外基质及自然杀伤细胞(NK细胞)的抗肿瘤活性产生影响^[24]。

另一方面,CD8⁺T细胞包括细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)和肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)等。CTLs可通过分泌IFN- γ 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和颗粒酶B(granzyme B, GZMB)来抑制肿瘤进展。研究显示,OSCC侵袭前沿区域聚集了大量CD8⁺T细胞,这些细胞的密度与患者的总生存期正相关,说明CD8⁺T细胞是遏制OSCC进展的关键防线及预后评估指标^[25]。组织驻留记忆T细胞(tissue-resident memory T cells, TRMs)作为一种特殊的记忆T细胞,在免疫应答中发挥着极其重要的作用。目前对TRMs的研究主要集中于CD8⁺TRMs,常以表面标记分子CD69、CD103的表达进行分类,其中CD69(一种C型凝集素)是TRMs形成的关键标志,它与1-磷酸鞘氨醇受体1结合,阻止T细胞离开外周组织,从而使TRMs前体细胞长期存在于外周组织并发育为TRMs。而CD103(又称为 α E整合素)是TRMs的另一个关键标志,它可与E-cadherin结合,促进和维持CD8⁺TRMs驻留在小肠上皮、脑和皮肤等非淋巴组织中^[26]。本研究利用免疫组化和流式细胞术检测发现,与对照组相比,激活组小鼠肿瘤组织内CD8⁺T细胞表达显著降低;同时,激活组中的

CD69在CD4⁺ T及CD8⁺ T细胞上的表达均有所提升,而CD103在CD8⁺ T细胞上的表达相对较低。这表明, *P.g*可通过改变OSCC肿瘤微环境中CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞的比例及功能,造成肿瘤细胞免疫逃逸,从而促进OSCC的恶性生物学行为。因此,调节T淋巴细胞的功能有望成为抑制OSCC进展的新方向。

在肿瘤微环境中,上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)受到一系列复杂的信号传导途径及多种细胞因子的调控,诸如TGF- β 、Wnt、Notch等信号路径以及Twist、Snail、Slug等细胞因子^[27],它们通过激活特定的转录因子来驱动肿瘤细胞的EMT过程^[28-29]。其中,转移性癌症通常表现为Twist过表达或者启动子甲基化,这些变化主要是和上皮标志物E-cadherin减少及间质标志物如N-cadherin的增多有一定的关系。此外, Ki-67在肿瘤发生发展中有着重要作用,不仅是肿瘤侵袭性的标志,其表达量还直接反映了细胞的增殖状态,与多种肿瘤的起始、进展、浸润深度、转移潜能及不良临床结局紧密相关,是预测肿瘤演进趋势的关键因子^[30]。本研究发现,在小鼠肿瘤模型中, *P.g*激活组小鼠E-cadherin呈现低表达,而N-cadherin及上游转录因子Twist呈现高表达,由此可见, *P.g*诱导OSCC加速EMT进展,促进肿瘤细胞侵袭及转移。

OSCC的发生发展依赖于丰富的血管网络支持。癌症通过释放VEGF,有效刺激内皮细胞分裂和新血管网络的构建,从而确保肿瘤获得必要的血液供给^[31]。VEGF不仅促进了血管网络的扩展,还增强了血管的通透性,延长了肿瘤细胞的存活时间,因此VEGF的高水平表达,常被视为口腔癌预后不佳的一个标志^[32]。同时CD31,作为另一关键的血管生成促进因素,其表达量的上升同样与肿瘤新生血管的萌发、肿瘤细胞的迅速增殖以及癌组织的深层浸润密切相关。为深入研究这些机制,本研究中我们通过构建口腔癌小鼠模型,并运用免疫组化技术对实验小鼠的肿瘤组织进行了细致的VEGF和CD31表达分析。结果显示, *P.g*激活处理的小鼠肿瘤组织中,这两种分子的表达均高于对照组。通过本研究发现,抗血管生成疗法后有望成为控制OSCC生长的治疗靶点。

综上所述,本研究结果发现, *P.g*可能通过影响肿瘤微环境中CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞比例及功能变化,介导肿瘤细胞免疫逃逸,从而加速OSCC的恶性进展。这一发现揭示了致病微生物在肿瘤发展中的重要作用,有望为口腔鳞状细胞癌的治疗提供新的思路。

* * *

作者贡献声明 张一博负责论文构思、数据审编、研究方法、可视化和

初稿写作,许立明负责正式分析和初稿写作,乃吉拜·莫敏负责验证及可视化,李娇阳负责调查研究,凌彬负责论文构思、经费获取、研究项目管理、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution ZHANG Yibo is responsible for conceptualization, data curation, methodology, visualization, and writing--original draft. XU Liming is responsible for formal analysis and writing--original draft. NAIJIBAI·MOMIN is responsible for validation and visualization. LI Jiaoyang is responsible for investigation. LING Bin is responsible for conceptualization, funding acquisition, project administration, supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests

参 考 文 献

- [1] XUE Y, SONG X, FAN S, *et al*. The role of tumor-associated macrophages in oral squamous cell carcinoma. *Front Physiol*, 2022, 13: 959747. doi: 10.3389/fphys.2022.959747.
- [2] MODY M D, ROCCO J W, YOM S S, *et al*. Head and neck cancer. *Lancet*, 2021, 398(10318): 2289-2299. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01550-6.
- [3] LI R, WANG Y, DU J, *et al*. Graphene oxide loaded with tumor-targeted peptide and anti-cancer drugs for cancer target therapy. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 1725. doi: 10.1038/s41598-021-81218-3.
- [4] BILOTTA M T, ANTIGNANI A, FITZGERALD D J. Managing the TME to improve the efficacy of cancer therapy. *Front Immunol*, 2022, 13: 954992. doi: 10.3389/fimmu.2022.954992.
- [5] KIM S, MIN H, NAH J, *et al*. Defective N-glycosylation in tumor-infiltrating CD8(+) T cells impairs IFN-gamma-mediated effector function. *Immunol Cell Biol*, 2023, 101(7): 610-624. doi: 10.1111/imcb.12647.
- [6] YANG G, CAI S, HU M, *et al*. Functional status and spatial architecture of tumor-infiltrating CD8+ T cells are associated with lymph node metastases in non-small cell lung cancer. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 320. doi: 10.1186/s12967-023-04154-y.
- [7] CENERENTI M, SAILLARD M, ROMERO P, *et al*. The era of cytotoxic CD4 T cells. *Front Immunol*, 2022, 13: 867189. doi: 10.3389/fimmu.2022.867189.
- [8] MANFIOLETTI G, FEDELE M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11386. doi: 10.3390/ijms241411386.
- [9] AKRIDA I, MULITA F, PLACHOURI K M, *et al*. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in metaplastic breast cancer and phyllodes breast tumors. *Med Oncol*, 2023, 41(1): 20. doi: 10.1007/s12032-023-02259-4.
- [10] CHEN Y P, WANG Y Q, LV J W, *et al*. Identification and validation of novel microenvironment-based immune molecular subgroups of head and neck squamous cell carcinoma: implications for immunotherapy. *Ann Oncol*, 2019, 30(1): 68-75. doi: 10.1093/annonc/mdy470.
- [11] JIANG Y, ZHAN H. Communication between EMT and PD-L1 signaling: New insights into tumor immune evasion. *Cancer Lett*, 2020, 468: 72-81. doi: 10.1016/j.canlet.2019.10.013.
- [12] LI B, CUI Y, NAMBIAR D K, *et al*. The immune subtypes and landscape of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(12): 3528-3537. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4085.
- [13] SINGH S, SINGH A K. *Porphyromonas gingivalis* in oral squamous cell carcinoma: a review. *Microbes Infect*, 2022, 24(3): 104925. doi: 10.1016/immicinf.2021.104925.
- [14] PENG X, CHENG L, YOU Y, *et al*. Oral microbiota in human systematic diseases. *Int J Oral Sci*, 2022, 14(1): 14. doi: 10.1038/s41368-022-00163-7.
- [15] WEN L, MU W, LU H, *et al*. *Porphyromonas gingivalis* promotes oral squamous cell carcinoma progression in an immune microenvironment. *J*

- Dent Res*, 2020, 99(6): 666-675. doi: 10.1177/0022034520909312.
- [16] 刘雪, 许立明, 刘朗清, 等. 牙龈卟啉单胞菌上调CCL20的表达对口腔鳞状细胞表型的影响. *新疆医科大学学报*, 2024, 47(3): 322-328. doi: 10.3969/j.issn.1009-5551.2024.03.004.
- LIU X, XU L M, LIU L Q, *et al.* Effect of porphyromonas gingivalis (*P. g*) upregulation of CCL20 expression on oral squamous cell phenotyp. *J Xinjiang Med Univ*, 2024, 47(3): 322-328. doi: 10.3969/j.issn.1009-5551.2024.03.004.
- [17] KIKUCHI M, YAMASHITA D, HARA S, *et al.* Clinical significance of tumor-associated immune cells in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2021, 43(2): 534-543. doi: 10.1002/hed.26498.
- [18] YU W, LEI Q, YANG L, *et al.* Contradictory roles of lipid metabolism in immune response within the tumor microenvironment. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 187. doi: 10.1186/s13045-021-01200-4.
- [19] HU J, LAZAR A J, INGRAM D, *et al.* Cell membrane-anchored and tumor-targeted IL-12 T-cell therapy destroys cancer-associated fibroblasts and disrupts extracellular matrix in heterogenous osteosarcoma xenograft models. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(1): e006991. doi: 10.1136/jitc-2023-006991.
- [20] IRFAN M, DELGADO R, FRIAS-LOPEZ J. The oral microbiome and cancer. *Front Immunol*, 2020, 11: 591088. doi: 10.3389/fimmu.2020.591088.
- [21] CHEN Y, CHEN X, YU H, *et al.* Oral microbiota as promising diagnostic biomarkers for gastrointestinal cancer: a systematic review. *Oncol Targets Ther*, 2019, 12: 11131-11144. doi: 10.2147/OTT.S230262.
- [22] SUN J, TANG Q, YU S, *et al.* Role of the oral microbiota in cancer evolution and progression. *Cancer Med*, 2020, 9(17): 6306-6321. doi: 10.1002/cam4.3206.
- [23] PERERA M, AI-HEBISHI N N, SPEICHER D J, *et al.* Emerging role of bacteria in oral carcinogenesis: a review with special reference to periopathogenic bacteria. *J Oral Microbiol*, 2016, 8: 32762. doi: 10.3402/jom.v8.32762.
- [24] GAO R, ZHANG W, JIANG Y, *et al.* Eldecalsitol effectively prevents alveolar bone loss by partially improving Th17/Treg cell balance in diabetes-associated periodontitis. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1070117. doi: 10.3389/fbioe.2023.1070117.
- [25] SHIMIZU S, HIRATSUKA H, KOIKE K, *et al.* Tumor-infiltrating CD8(+) T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med*, 2019, 8(1): 80-93. doi: 10.1002/cam4.1889.
- [26] IJIMA N, IWASAKI A. Tissue instruction for migration and retention of TRM cells. *Trends Immunol*, 2015, 36(9): 556-564. doi: 10.1016/j.it.2015.07.002.
- [27] MATSUOKA T, YASHIRO M. The role of the transforming growth factor- β signaling pathway in gastrointestinal cancers. *Biomolecules*, 2023, 13(10): 1551. doi: 10.3390/biom13101551.
- [28] WANG F, YI J, CHEN Y, *et al.* PRSS2 regulates EMT and metastasis via MMP-9 in gastric cancer. *Acta Histochem*, 2023, 125(6): 152071. doi: 10.1016/j.acthis.2023.152071.
- [29] HU X, XIANG F, FENG Y, *et al.* Neutrophils promote tumor progression in oral squamous cell carcinoma by regulating EMT and JAK2/STAT3 signaling through chemerin. *Front Oncol*, 2022, 12: 812044. doi: 10.3389/fonc.2022.812044.
- [30] SWAIN S, NISHAT R, RAMACHANDRAN S, *et al.* Comparative evaluation of immunohistochemical expression of MCM2 and Ki67 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther*, 2022, 18(4): 997-1002. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_10_20.
- [31] LOPEZ-GRANIEL C M, TAMEZ D L D, MENESES-GARCIA A, *et al.* Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res*, 2001, 20(4): 463-468.
- [32] SMITH B D, SMITH G L, CARTER D, *et al.* Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 2000, 18(10): 2046-2052. doi: 10.1200/JCO.2000.18.10.2046.

(2024-12-01收稿, 2025-05-06修回)

编辑 刘华



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2025 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*