

# 干性相关分子 Nanog 在食管鳞状细胞癌组织中高表达并促进食管鳞癌细胞的侵袭转移:基于激活 TGF- $\beta$ 信号通路

孙畅<sup>1</sup>, 郑士耀<sup>1,3</sup>, 李梅<sup>1,4</sup>, 杨铭<sup>1</sup>, 秦梦园<sup>1</sup>, 徐媛<sup>1</sup>, 梁伟华<sup>1</sup>, 胡建明<sup>1</sup>, 王良海<sup>1</sup>, 李锋<sup>1,2</sup>, 周虹<sup>5</sup>, 杨兰<sup>1</sup>

<sup>1</sup>石河子大学医学院病理系//石河子大学第一附属医院病理科, 新疆维吾尔自治区 石河子 832000; <sup>2</sup>首都医科大学附属北京朝阳医院病理科, 北京 100000; <sup>3</sup>乳山市人民医院病理科, 山东 威海 264200; <sup>4</sup>烟台市莱阳中心医院病理科, 山东 烟台 264000; <sup>5</sup>澳大利亚悉尼大学 ANZAC 研究所, 悉尼 2050

**摘要:**目的 探讨食管鳞状细胞癌(鳞癌)中干性相关分子胚胎干细胞关键因子(Nanog)和侵袭迁移相关分子基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白的表达及其之间的调控关系。方法 运用免疫组织化学技术检测127例食管鳞癌组织和82例癌旁正常组织中Nanog和MMP-2/MMP-9蛋白的表达情况,分析Nanog和MMP-2/MMP-9蛋白的表达水平、相关性以及与食管鳞癌患者的临床病理参数和预后之间的关系;采用GEO数据库分析Nanog等干性相关分子主要富集通路;应用TIMER在线网站分析食管癌中T $\beta$ R1和MMP-2及MMP-9的相关性。在体外运用siRNA转染的方式将食管鳞癌细胞株分为正常对照组、Nanog低表达组,采用划痕实验分析其对食管鳞癌细胞迁移的影响,qRT-PCR及Western blotting检测两组之间T $\beta$ R1、p-Smad2/3、MMP-2/MMP-9的表达情况。结果 Nanog和MMP-2/MMP-9蛋白在食管鳞癌组织中表达均上调( $\chi^2=70.475, P<0.01$ ;  $\chi^2=34.415, P<0.01$ ;  $\chi^2=46.605, P<0.01$ ),且呈正相关( $r=0.205, P=0.045$ ;  $r=0.307, P<0.001$ )。Nanog和MMP-2/MMP-9蛋白表达水平与食管鳞癌的浸润深度相关( $\chi^2=23.9, P<0.01$ ;  $\chi^2=6.029, P<0.05$ ;  $\chi^2=11.89, P<0.05$ ),有淋巴结转移的样本中,MMP-2/MMP-9蛋白表达水平高于无淋巴结转移的样本( $\chi^2=10.08, P<0.01$ ;  $\chi^2=5.731, P<0.05$ )。MMP-2/MMP-9蛋白表达与食管鳞癌患者的年龄、性别和肿瘤分化程度无相关性( $P>0.05$ )。Kaplan-Meier生存分析显示,Nanog和MMP-2/MMP-9蛋白高表达组的食管鳞癌患者生存时间短于低表达组( $P<0.001$ ;  $P=0.004$ ;  $P=0.017$ );生物信息学分析显示,Nanog等干性相关分子主要富集在转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )信号通路,MMP-2/MMP-9与T $\beta$ R1表达在食管癌中呈正相关关系。体外划痕实验结果显示,Nanog促进食管鳞癌细胞系的迁移;qRT-PCR及Western blotting结果显示,敲低Nanog后,T $\beta$ R1、p-Smad2/3、MMP-2/MMP-9的表达水平明显降低。结论 Nanog和MMP-2/MMP-9蛋白在食管鳞癌患者组织中高表达且呈正相关,其与食管鳞癌患者的肿瘤浸润深度、淋巴结转移及预后密切相关,且Nanog通过TGF- $\beta$ 信号通路影响MMP-2/MMP-9蛋白的表达。

**关键词:**食管鳞状细胞癌;胚胎干细胞关键因子;基质金属蛋白酶-2/基质金属蛋白酶-9;浸润转移;生存分析

## High expression of the stemness-associated molecule Nanog in esophageal squamous cell carcinoma tissues promotes tumor invasion and metastasis by activating the TGF- $\beta$ signaling pathway

SUN Chang<sup>1</sup>, ZHENG Shiyao<sup>1,3</sup>, LI Mei<sup>1,4</sup>, YANG Ming<sup>1</sup>, QIN Mengyuan<sup>1</sup>, XU Yuan<sup>1</sup>, LIANG Weihua<sup>1</sup>, HU Jianmin<sup>1</sup>, WANG Lianghai<sup>1</sup>, LI Feng<sup>1,2</sup>, ZHOU Hong<sup>5</sup>, YANG Lan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Department of Pathology of First Affiliated Hospital, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000, China; <sup>2</sup>Department of Pathology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100000, China; <sup>3</sup>Department of Pathology, Rushan People's Hospital, Weihai 264200, China; <sup>4</sup>Department of Pathology, Laiyang Central Hospital, Yantai 264000, China; <sup>5</sup>ANZAC Research Institute, University of Sydney, Sydney 2050, Australia

**Abstract: Objective** To investigate the expression of Nanog and its regulatory relationship with MMP-2/MMP-9 proteins in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** We detected Nanog and MMP-2/MMP-9 protein expressions in 127 ESCC tissues and 82 adjacent normal tissues using immunohistochemistry and explored their correlations with the clinicopathological parameters and prognosis of the patients. GEO database was utilized to analyze the pathways enriched with the stemness-related molecules including Nanog, and TIMER online tool was used to analyze the correlations among T $\beta$ R1, MMP-2, and MMP-9 in esophageal cancer. **Results** Nanog and MMP-2/MMP-9 proteins were significantly upregulated in ESCC tissues and positively intercorrelated. Their expression levels were closely correlated with infiltration depth and lymph node metastasis of ESCC but not with age, gender, or tumor differentiation. The patients with high expressions of Nanog and MMP-2/MMP-9 had significantly shorter survival time. Bioinformatics analysis showed enrichment of stemness-associated molecules in the TGF- $\beta$  signaling pathway, and the expressions of MMP-2/MMP-9 and T $\beta$ R1 were positively correlated. In cultured ESCC cells, Nanog knockdown significantly decreased the expression of T $\beta$ R1, p-Smad2/3, MMP-2, and MMP-9 and strongly inhibited cell migration. **Conclusion** The high expressions of Nanog, MMP-2, and MMP-9, which are positively correlated, are

closely related with invasion depth, lymph node metastasis, and prognosis of ESCC. Nanog regulates the expressions of MMP-2/MMP-9 proteins through the TGF- $\beta$  signaling pathway, and its high expression promotes migration of ESCC cells.

**Keywords:** esophageal squamous cell carcinoma; Nanog; MMP-2/MMP-9; infiltration and metastasis; survival analysis

收稿日期:2023-10-11

基金项目:国家自然科学基金(81860518);石河子大学国际科技合作推进计划项目(GJHZ202105);兵团重点癌症早诊早治项目(CZ002907)

Supported by Natural Science Foundation of China (81860518).

作者简介:孙畅,在读硕士研究生,E-mail: sunchangyysw@163.com

通信作者:杨兰,副教授,硕士生导师,E-mail: yl-branda@163.com

食管癌是最常见的恶性肿瘤之一,我国2020年食管癌发病率居恶性肿瘤排名第7位,死亡率居第5位<sup>[1]</sup>。食管癌患者预后较差,5年生存率为30.3%<sup>[2]</sup>,患者常死于癌症的转移复发<sup>[3]</sup>。研究表明,肿瘤干细胞是肿瘤发生发展、转移和复发的关键因素<sup>[4,5]</sup>。

胚胎干细胞关键因子(Nanog)在食管癌等恶性肿瘤中常存在异常表达<sup>[6]</sup>,是食管癌的干性标志物之一。研究表明,在肿瘤中Nanog可维持肿瘤干细胞干性特征,促进肿瘤细胞的侵袭、转移过程<sup>[7-9]</sup>。有研究显示,在胃癌细胞中敲低Nanog会导致基质金属蛋白酶-2(MMP-2)mRNA和蛋白表达水平下调从而抑制胃癌细胞MKN-45的迁移能力<sup>[10]</sup>。有文献报道食管癌中MMP-2和MMP-9表达明显增高,其表达与食管癌的浸润深度、淋巴结转移和血管浸润密切相关<sup>[11]</sup>。另有研究表明,在骨肉瘤干细胞中敲低转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )后MMP-2的水平明显降低<sup>[12]</sup>。但目前Nanog蛋白在食管鳞癌组织中的异常表达的调控机制尚不清楚。

为探讨食管鳞癌组织中干性分子Nanog的表达及其与侵袭转移分子MMP-2/9的相关性,本研究采用免疫组化技术联合检测Nanog和MMP-2/9蛋白在食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中的表达情况,初步探讨Nanog和MMP-2/9蛋白表达水平与食管鳞癌浸润深度、淋巴结转移及患者生存的关系,并通过生物信息学分析它们可能存在的调控信号通路,进而从细胞层面验证Nanog可能通过TGF- $\beta$ 信号通路调控MMP-2、MMP-9的表达从而影响食管癌的侵袭转移,为进一步寻找食管鳞癌的发生发展及预后分子靶标提供参考依据。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床资料

收集2009年1月~2015年12月伊犁友谊医院和新华医院的127例食管鳞癌组织样本及82例癌旁正常组织标本。纳入标准:经术后病理检查结果确定为食管鳞癌;术前未进行放疗或新辅助免疫治疗;具有福尔马林固定后石蜡包埋组织;具有相关临床病理资料。排除标准:经术后病理检查结果食管腺癌或食管鳞癌合并腺癌;合并其他恶性肿瘤或有恶性肿瘤个人史;合并心、肝、肾等脏器功能不全;临床病理信息不完整。对127例食管癌根治手术患者进行随访,随访终点为患者死亡时间或最后随访时间(2022年12月)。本研究获石河子大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理批号:2018-023-01)。

食管鳞状细胞癌组织样本127例,病理诊断年龄23~76岁,其中男性78例、女性49例;食管癌旁正常组织样本共82例,年龄23~74岁,其中男性54例、女性28例(表1)。对食管癌旁正常组织和食管鳞癌组织样本进行HE染色,在两位病理专家独立阅片后,将其分为正

常食管组织、食管高分化鳞癌、食管中分化鳞癌及食管低分化鳞癌。

表1 127例食管癌患者的临床病理特征

Tab.1 Clinical and pathological characteristics of 127 esophageal cancer patients

Clinicopathological parameters	n	Percentage (%)
Age (year)		
<60	73	57.48
≥60	54	42.52
Gender		
Male	78	61.42
Female	49	38.58
Differentiation		
High	40	31.5
Medium	72	56.69
Low	15	11.81
T stage		
T1	16	12.6
T2	52	40.94
T3-T4	40	46.46
Lymph node metastasis		
+	84	66.14
-	43	33.86

### 1.2 免疫组织化学染色

ESCC样本及配对正常组织样本制备组织芯片,将包埋好的组织芯片蜡块连续切片,石蜡切片经二甲苯脱蜡后,梯度乙醇进行脱水,切片加枸橼酸缓液进行微波抗原修复;切片加Nanog抗体(Cell Signaling Technology, 1:600)、MMP-2抗体(Proteintech, 1:250)、MMP-9抗体(Santa Cruz, 1:100),4℃孵育过夜;加二抗孵育后用DAB显色,苏木素复染。检测122例(127例中5例脱片或无法判读)食管鳞癌组织和79例(82例中3例脱片或无法判读)癌旁正常组织中Nanog蛋白表达情况,99例(127例中28例脱片或无法判读)食管鳞癌组织和73例(82例中9例脱片)癌旁正常组织中MMP-2的蛋白表达状况,及119例(127例中8例脱片或无法判读)食管鳞癌组织和81例(82例中1例脱片)癌旁正常组织中MMP-9的蛋白表达状况。免疫组化染色结果由两位病理学专家阅片,结果判定根据阳性细胞比例及染色程度进行评分。

### 1.3 生物信息学分析

在GEO(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库中筛选胚胎干性相关实验数据,排除敲低或过表达基因等实验干扰数据集后选择GSE13834数据集进行分

析。利用GEO2R在线分析工具分析GSE13834数据集中具有差异的mRNA;利用DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)网站分析差异表达的mRNA主要富集的通路。TIMER网站(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)分析TβR1和MMP-2及MMP-9的相关性。

#### 1.4 细胞培养及转染

食管癌细胞株TE-1细胞购自上海复祥生物科技有限公司。将对数生长期的TE-1细胞按照 $1.5 \times 10^5$ /孔接种于六孔板(含有10%胎牛血清的RPMI1640),细胞融合达到60%~70%时加入siRNA与Lip2000的混合物到无血清培养基,孵育6h后更换为完全培养基,48h后进行后续实验操作。siRNA由上海吉玛公司合成,Nanog的靶序列如下:正向5'-GGAGGUCCUAUUUCUCUA A-3'和反向5'-UUAGAGAAUAGGACCUCC-3'。

#### 1.5 划痕实验

将细胞以 $2 \times 10^5$ /孔的密度接种于六孔板,培养至90%融合。用200 μL无菌移液管尖端垂直在单层细胞上划一条线,在无血清培养基中培养。在0、12、24、48h时拍照,使用Image J测量划痕面积并计算迁移率,迁移率计算公式为:(0h划痕面积-12、24、48h划痕面积)/0h划痕面积 $\times 100\%$ 。

#### 1.6 Western blotting 实验

将转染48h后的细胞提取蛋白后,用10%的SDS-PAGE凝胶分离蛋白质,然后转移到PVDF膜上,用5%BSA封闭,并与所指示的一抗孵育,包括Nanog、TβR1、p-Smad2/3、MMP-2、MMP-9及β-actin,然后在室温下与二抗孵育2h。TBST洗膜5min共6次后加入显影液进行曝光显影。

#### 1.7 qRT-PCR 实验

使用RNA提取试剂盒提取总RNA,利用反转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific)和荧光定量PCR试剂盒(康为)分别进行反转录和定量分析,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA相对表达量。使用引物均由上海生工公司合成,引物序列:Nanog上游:5'-AATGGTGTGACGCAGGGATG-3',下游:5'-TGCACCAGGTCTGAGTGTTC-3';TGFβR1上游:5'-CCTCGAGATAGGCCGT TTGT-3',下游:5'-GCAATGGTAAACCAGTAGTTGGA-3'。Smad-2上游5'TGGGGACTGAGTACACCAAA-3',下游5'-ACTGTGAAGATCAGGCCAGC-3';MMP-2上游5'-TGCTGAAGGACACACTAAAGAAGATG-3',下游5'-GCTTGCAGGGAAGAAGTTGTAG-3';MMP-9上游5'-CGAAGTTTGACAGCGACAAGAA G-3',下游5'-CGGCACTGAGGAATGATCTAAGC-3';βactin上游5'-AACC GCGAGAAGATGACCCAG-3',下游5'-GGATAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'。

#### 1.8 统计学方法

临床样本量根据成组设计两样本率比较公式 $n = [(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \times 2\pi_c(1 - \pi_c)] / (\pi_1 - \pi_2)^2$ 计算,根据预实验得出Nanog食管鳞癌样本量阳性率 $\pi_1 = 65\%$ ,Nanog食管鳞癌旁组织样本量阳性率 $\pi_2 = 5\%$ ,设 $\alpha = 0.05$ , $\beta = 0.10$ ,计算得出最小样本量为11例/组,本实验在最小样本量的基础上随机收集所得。

使用统计学软件SPSS26.0进行数据分析。食管鳞癌及癌旁正常组织中的蛋白表达水平及其与食管癌患者临床病理参数的关系采用 $\chi^2$ 分析;使用Spearman秩相关分析Nanog和MMP-2/MMP-9蛋白在食管鳞癌中表达的相关性;采用Kaplan-Meier分析比较Nanog和MMP-2/MMP-9蛋白低表达和高表达患者之间总体生存的差异;两组间比较采用 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Nanog、MMP-2/MMP-9蛋白在食管鳞癌组织中表达上调

免疫组化结果显示,Nanog、MMP-2及MMP-9蛋白表达均主要定位于细胞浆中,其在食管鳞癌组织中的表达均明显高于癌旁正常组织(图1,表2, $P < 0.01$ )。

### 2.2 Nanog、MMP-2/MMP-9蛋白表达与食管鳞癌患者临床病理参数的关系

食管鳞癌样本组织中Nanog、MMP-2/MMP-9蛋白表达与肿瘤浸润深度密切相关( $\chi^2 = 23.9$ , $P < 0.01$ ; $\chi^2 = 6.029$ , $P < 0.05$ ; $\chi^2 = 11.89$ , $P < 0.05$ ),有淋巴结转移的样本中MMP-2/MMP-9蛋白表达高于无淋巴结转移样本( $\chi^2 = 10.08$ , $P < 0.01$ ; $\chi^2 = 5.731$ , $P < 0.05$ ),而Nanog蛋白表达在有淋巴结转移和无淋巴结转移的样本中差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。食管鳞癌组织中Nanog、MMP-2/MMP-9蛋白表达与年龄、性别和肿瘤分化程度相关性不显著( $P > 0.05$ ,表3)。

### 2.3 Nanog、MMP-2和MMP-9蛋白表达水平与食管鳞癌患者预后的关系

Kaplan-Meier生存分析显示,在食管鳞癌患者组织样本中Nanog、MMP-2及MMP-9低表达组的术后中位生存时间分别为40、30、32月,Nanog、MMP-2及MMP-9蛋白高表达组患者的术后中位生存时间均为19月。Nanog、MMP-2及MMP-9蛋白高表达组患者生存时间短于低表达患者( $P < 0.001$ , $P = 0.004$ , $P = 0.017$ ,图2)。

### 2.4 Nanog和MMP-2/MMP-9蛋白表达在食管鳞癌中呈正相关

相关分析结果显示,Nanog、MMP-2/MMP-9蛋白在食管鳞癌中表达均上调且呈正相关( $r = 0.205$ , $P = 0.045$ ; $r = 0.307$ , $P < 0.001$ ,表4)。

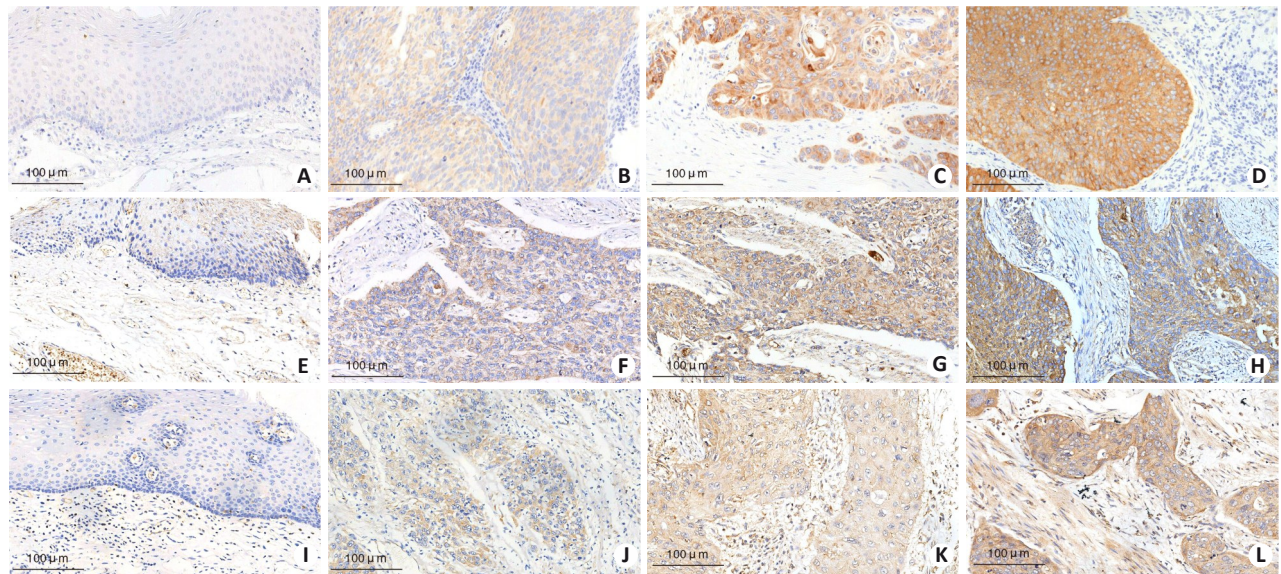


图1 食管鳞癌组织及癌旁正常组织中Nanog、MMP-2及MMP-9蛋白免疫组化染色结果

Fig. 1 Immunohistochemical staining of Nanog, MMP-2, and MMP-9 proteins in esophageal squamous cell carcinoma tissues and adjacent normal tissues. A: Negative expression of Nanog in adjacent normal tissues. B: Weak positive expression (1+) of Nanog in esophageal squamous cell carcinoma tissues. C: Moderate positive expression (2+) of Nanog in esophageal squamous cell carcinoma tissues. D: Strong positive expression (3+) of Nanog in esophageal squamous cell carcinoma tissues. E: Negative expression of MMP-2 in adjacent normal tissues. F: Weak positive expression (1+) of MMP-2 in esophageal squamous cell carcinoma tissues. G: Moderate positive expression (2+) of MMP-2 in esophageal squamous cell carcinoma tissues. H: Strong positive expression (3+) of MMP-2 in esophageal squamous cell carcinoma tissues. I: Negative expression (-) of MMP-9 in adjacent normal tissues. J: Weak positive expression (1+) of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma tissues. K: Moderate positive expression (2+) of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma tissues. L: Strong positive expression (3+) of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma tissues.

表2 食管鳞癌及癌旁组织中Nanog、MMP-2及MMP-9蛋白的表达情况

Tab.2 Expression of Nanog, MMP-2 and MMP-9 protein in esophageal squamous cell carcinoma and adjacent tissues

Protein	Tissue samples	n	High expression	Low expression	$\chi^2$	P
Nanog	ESCC tissue	122	79	43	70.475	<0.01
	paraneoplastic tissue	79	4	75		
MMP-2	ESCC tissue	99	58	41	35.415	<0.01
	paraneoplastic tissue	73	10	63		
MMP-9	ESCC tissue	119	60	59	46.605	<0.01
	paraneoplastic tissue	81	3	78		

### 2.5 Nanog 可能通过 TGF-β 信号通路影响 MMP-2/MMP-9 蛋白的表达

生物信息学分析显示,Nanog 等干性相关基因主要富集在 TGF-β 信号通路;TIMER 网站的相关性分析显示,食管癌中 TβR1 与 MMP-2/9 呈正相关(图 3)。Nanog 与 TβR1、p-Smad2/3 蛋白的表达水平呈正相关( $r=0.318, P=0.001; r=0.301, P=0.002$ ), 且 MMP-2/MMP-9 与 TβR1、p-Smad2/3 蛋白的表达水平也呈正相关( $r=0.448, P<0.001, r=0.303, P=0.004; r=0.202, P=0.045, r=0.239, P=0.015$ ,表 5)<sup>[13]</sup>。

### 2.6 体外细胞学实验分析探讨 Nanog 对食管鳞癌细胞迁移能力的影响

qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,si-Nanog 组 Nanog 的 mRNA 及蛋白表达水平明显低于对照组 ( $P<0.05$ ,图 4A、B)。划痕实验结果显示,与对照组相比,敲低 Nanog 后食管鳞癌细胞的迁移率明显降低 ( $P<0.05$ ,图 4C)。

### 2.7 Nanog 通过 TGF-β 信号通路促进食管鳞癌细胞的侵袭转移

qRT-PCR 和 Western blotting 结果显示,与对照组相比,敲低 Nanog 后 TGF-β 信号通路及侵袭转移相关分子的 mRNA 水平及蛋白水平均明显下降(图 5,  $P<0.05$ )。

表3 Nanog、MMP-2、MMP-9蛋白表达与食管鳞癌患者临床病理参数

Tab.3 Clinical-pathological parameters of patients with esophageal squamous cell carcinoma having high or low Nanog, MMP-2 and MMP-9 protein expressions

Clinicopathological parameters	Nanog			$\chi^2$	P	MMP-2			$\chi^2$	P	MMP-9			$\chi^2$	P
	n	High expression	Low expression			n	High expression	Low expression			n	High expression	Low expression		
<b>Gender</b>															
Male	76	50	26	0.095	0.758	57	31	26	0.977	0.41	69	35	34	0.006	1.000
Female	46	29	17			42	27	15			50	25	25		
<b>Age (year)</b>															
<60	70	45	25	0.016	0.900	60	40	20	4.099	0.060	72	37	35	0.068	0.852
≥60	52	34	18			39	18	21			47	23	24		
<b>T stage</b>															
T1	15	2	13	23.90	<0.01	8	2	6	6.029	0.049	14	1	13	11.89	0.003
T2	50	31	19			45	31	14			50	28	22		
T3-T4	57	46	11			46	25	21			55	31	24		
<b>Lymph node metastasis</b>															
+	80	55	25	1.626	0.202	66	46	20	10.08	0.020	79	46	33	5.731	0.020
-	42	24	18			33	12	21			40	14	26		
<b>Differentiation</b>															
High	36	19	17	5.483	0.064	31	18	13	0.268	0.875	13	6	7	2.534	0.282
Medium	71	47	24			59	34	25			67	38	29		
Low	15	13	2			9	6	3			39	16	23		

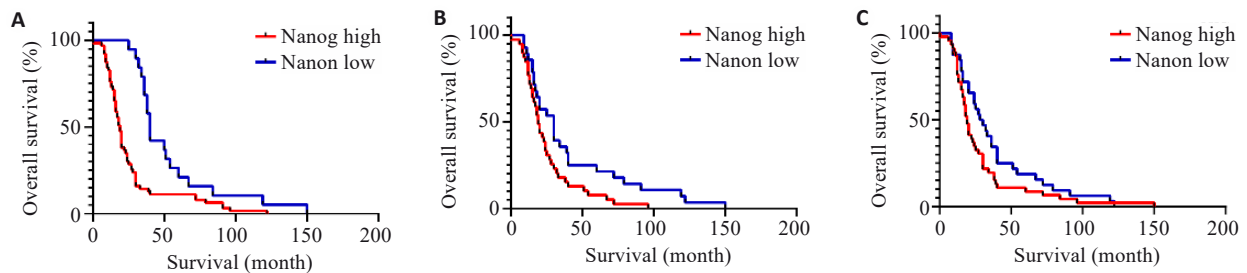


图2 Nanog、MMP-2及MMP-9蛋白表达水平与食管鳞癌患者术后生存时间关系的生存曲线

Fig.2 Postoperative survival curves of esophageal squamous cell carcinoma patients with low and high Nanog, MMP-2 and MMP-9 protein expressions. A: Survival curves of patients with high and low Nanog expressions ( $P < 0.001$ ). B: Survival curves of patients with high and low MMP-2 protein expression ( $P = 0.004$ ). C: Survival curves of patients with high and low MMP-9 protein expressions ( $P = 0.017$ ).

表4 食管癌中Nanog蛋白表达与侵袭迁移相关蛋白表达的相关性

Tab.4 Correlation between expressions of Nanog and invasion- and migration-related proteins in esophageal cancer

Nanog	MMP-2			r	P	MMP-9			r	P
	n	High expression	Low expression			n	High expression	Low expression		
High expression	66	43	23	0.205	0.045	74	46	28	0.307	0.001
Low expression	30	13	17			40	12	28		

### 3 讨论

食管癌是我国高发的胃肠道恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率高于全球平均水平<sup>[14]</sup>。多数食管癌患者出现症状时已是中晚期,易发生转移导致生存预后不佳。

因此,探究食管癌侵袭转移机制,寻找新的治疗及评估预后标志物是改善患者预后、提高生存率的重要手段。

有研究表明肿瘤侵袭转移的发生是由于肿瘤干细胞的存在<sup>[15]</sup>,而Nanog是一种参与胚胎干细胞自我更新

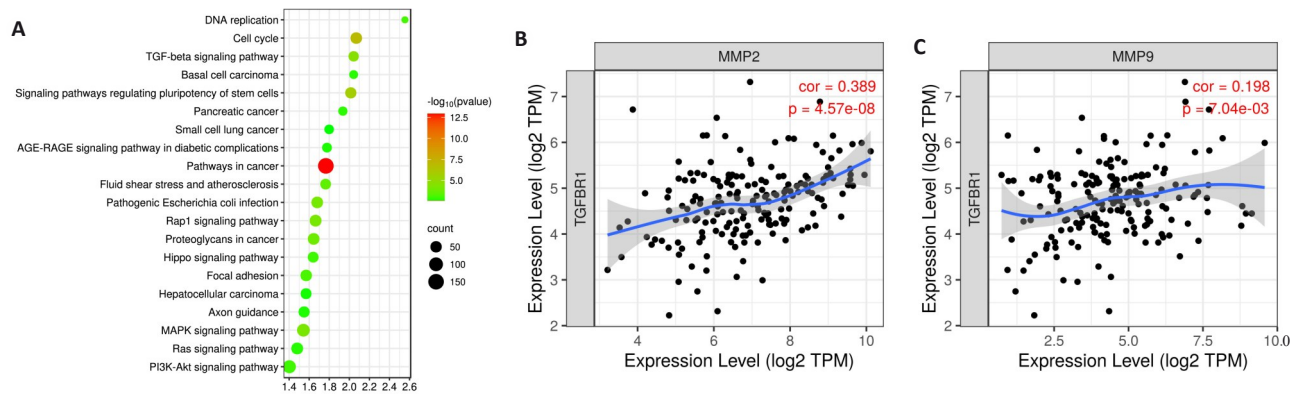


图3 生物信息学分析

Fig.3 Bioinformatics analysis. A: KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in the gene chip dataset GSE13834. B: Scatter plot showing the correlation between TβR1 and MMP-2 expression in esophageal cancer. C: Scatter plot showing the correlation between TβR1 and MMP-9 expression in esophageal cancer.

表5 食管癌中Nanog、MMP-2及MMP-9蛋白表达与TGFβ信号通路相关蛋白表达的相关性

Tab.5 Correlation of Nanog, MMP-2 and MMP-9 protein expressions with expressions of TGF-β signaling pathway proteins in ESCC

Protein		TβR1		r	P	p-Smad2/3		r	P		
		n	High expression			Low expression	n			High expression	Low expression
Nanog	High expression	68	50	18	0.318	0.001	68	50	18	0.301	0.002
	Low expression	32	13	19			35	15	20		
MMP-2	High expression	56	47	9	0.448	<0.001	52	40	12	0.303	0.004
	Low expression	47	18	29			55	27	28		
MMP-9	High expression	53	39	14	0.202	0.045	54	40	14	0.239	0.015
	Low expression	50	26	24			51	27	24		

的转录因子<sup>[16]</sup>,参与维持肿瘤干细胞的干性特征,同时,它还可作为致癌基因,Nanog异常表达与多种癌症进展有关。本实验免疫组化结果显示,Nanog蛋白在食管鳞癌组织中高表达,且Nanog高表达的食管鳞癌患者浸润深度高于低表达患者,进一步Kaplan-Meier法分析显示Nanog高表达组患者术后生存时间短于低表达组。这说明Nanog蛋白在食管鳞癌组织中高表达,其蛋白表达是影响食管鳞癌浸润及影响患者术后生存的重要因素。此外,有研究发现在上皮源性恶性肿瘤舌鳞状细胞癌和尿路上皮癌中Nanog蛋白在癌组织中均呈高表达,且其蛋白高表达与患者不良预后密切相关<sup>[17, 18]</sup>。有研究表明,Nanog在食管鳞癌组织中高表达,其蛋白表达除与浸润深度相关外还与肿瘤分化程度、淋巴结转移相关<sup>[19]</sup>。这与本研究结果一致。

MMPs是生长性肿瘤发生侵袭转移常见的病理因素之一<sup>[20]</sup>,有研究表明在口腔鳞状细胞癌中抑制Nanog基因会降低MMP-2/9蛋白的表达从而减弱口腔鳞状细胞癌的侵袭迁移能力<sup>[21]</sup>,MMP家族蛋白酶在生理和病理环境中对细胞外基质(ECM)的降解和重塑起着至关重要的作用<sup>[22]</sup>,这些蛋白在炎症、肿瘤发生和血管生成

中发挥着充分作用<sup>[23]</sup>。本实验结果表明,MMP-2/9蛋白在食管鳞癌中高表达且与浸润深度、淋巴结转移密切相关,生存分析提示MMP-2/9是影响食管鳞癌患者术后生存的重要因素。已有研究表明,MMP-2/9在包括膀胱癌、乳腺癌、食管癌及头颈癌等多种肿瘤中表达均上调<sup>[24]</sup>。

本研究 Spearman 秩相关分析显示,Nanog与MMP-2/9蛋白表达呈正相关。我们通过GEO数据库筛选干性分子并对差异基因进行通路富集分析发现,Nanog等干性分子主要富集在TGF-β等信号通路;同时在线网站TIMER分析发现TβR1与MMP-2/9呈正相关,提示Nanog可能通过TGF-β信号通路影响MMP-2/MMP-9的表达。本课题组前期在同一批食管鳞癌芯片组织中的研究表明,TβR1、p-Smad2/3蛋白在食管鳞癌中高表达且TGF-β/Smad信号通路与食管鳞癌的发生发展及预后密切相关<sup>[13]</sup>。因此,进一步分析Nanog、MMP-2/9蛋白与TβR1、p-Smad2/3蛋白表达的相关性,结果显示Nanog与MMP-2/9蛋白表达均与TGF-β/Smad信号通路蛋白表达成正相关,这与本研究生信结果一致。此外,体外实验结果表明敲低Nanog后TGF-β信号通路关键分子以及MMP-2、MMP-9的表达均降低

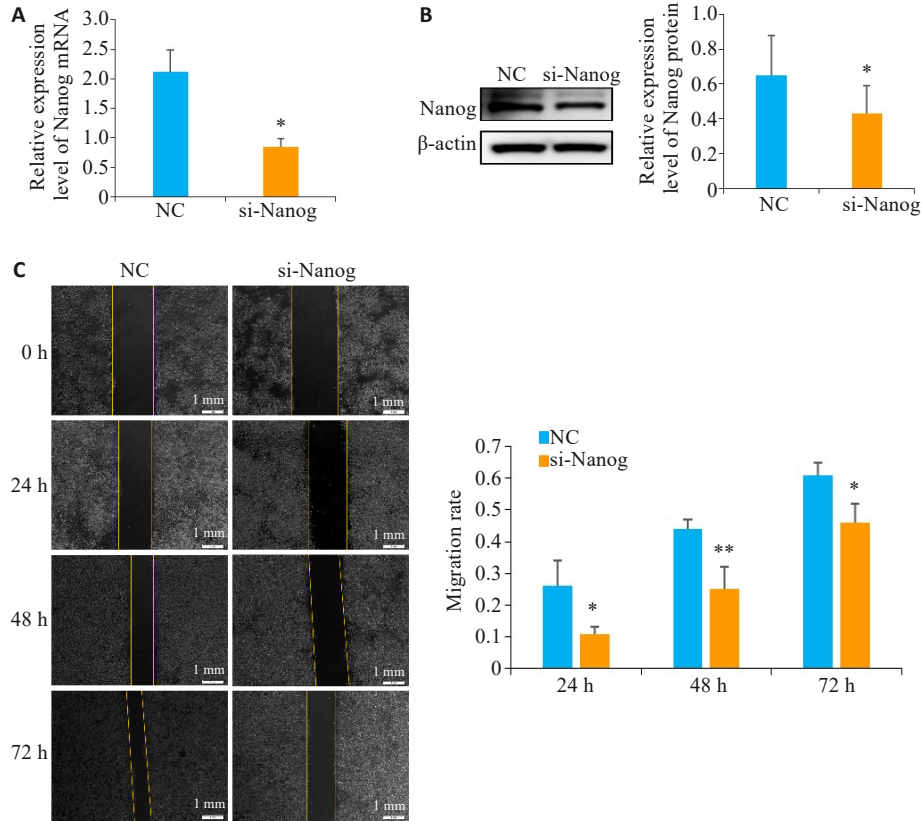


图4 Nanog 基因敲低对食管鳞癌细胞体外迁移的影响

Fig.4 Effect of Nanog knockdown on migration of esophageal squamous cell carcinoma cells. A: qRT-PCR of Nanog mRNA expression levels after Nanog knockdown ( $P<0.05$ ). B: Western blotting of Nanog protein expression after Nanog knockdown. C: Scratch assay for assessing changes in migration ability of TE-1 cells after Nanog knockdown. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs NC group.

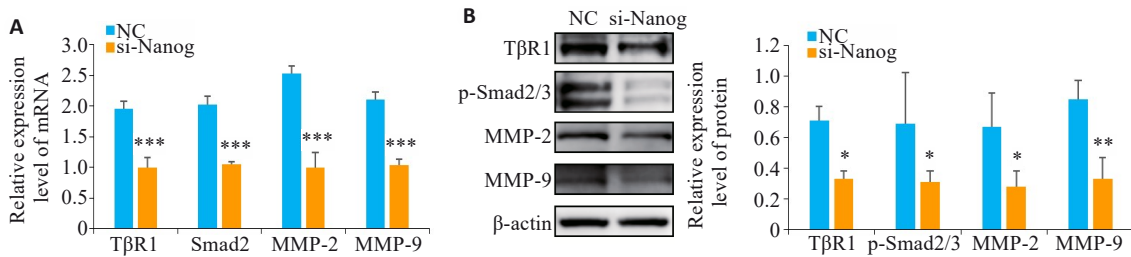


图5 敲低Nanog后TGF-β信号通路及侵袭迁移相关分子表达

Fig.5 Expression of TGF-β signaling pathway and invasion- and migration-related molecules after Nanog knockdown. A: qRT-PCR of TβR1, Smad2, MMP-2, and MMP-9 mRNA levels after Nanog knockdown. B: Western blotting of TβR1, p-Smad2/3, MMP-2, and MMP-9 protein levels after Nanog knockdown. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs NC group.

且食管鳞癌细胞的迁移率降低,由此得出结论:Nanog 通过 TGF-β/Smad 信号通路影响食管癌的侵袭转移。有研究发现在食管癌中敲低 Nanog 后 MMP-9 mRNA 水平降低<sup>[8]</sup>;在前列腺癌中沉默 Nanog 会降低 TGF-β1 的表达,并降低 Smad2 的磷酸化<sup>[25]</sup>;另有研究表明 TGF-β1 通过 NF-κB 依赖性途径增强神经施万细胞中 MMP-9 的表达<sup>[26]</sup>。这些研究为本文观点提供了有利的证据。

综上所述,本研究通过免疫组织化学染色发现食管癌组织中 Nanog、MMP-2、MMP-9 蛋白均高表达且呈正相关,它们与食管癌浸润深度、淋巴结转移及不良预后密切相关;体外实验表明 Nanog 通过 TGF-β 信号通路调控 MMP-2、MMP-9 的表达从而影响食管癌的侵袭迁移。这为进一步研究 Nanog 影响食管鳞癌浸润转移的分子机制奠定了基础,并有望为食管鳞癌的治疗及预后提供新的参考和方向。

## 参考文献:

- [1] 郑荣寿, 陈 茹, 韩冰峰, 等. 2022年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46(3): 221-31.
- [2] Zeng HM, Chen WQ, Zheng RS, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries[J]. Lancet Glob Health, 2018, 6(5): e555-67.
- [3] Nafteux PR, Lerut AM, Moons J, et al. International multicenter study on the impact of extracapsular lymph node involvement in primary surgery adenocarcinoma of the esophagus on overall survival and staging systems[J]. Ann Surg, 2015, 262(5): 809-15.
- [4] Zhu ZP, Xu JH, Li LL, et al. Effect of gastric cancer stem cell on gastric cancer invasion, migration and angiogenesis[J]. Int J Med Sci, 2020, 17(13): 2040-51.
- [5] Li D, Peng XQ, He GP, et al. Crosstalk between autophagy and CSCs: molecular mechanisms and translational implications[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(7): 409-13.
- [6] Pádua D, Figueira P, Ribeiro I, et al. The relevance of transcription factors in gastric and colorectal cancer stem cells identification and eradication[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 442-9.
- [7] Vasefifar P, Motafakkerzad R, Maleki LA, et al. Nanog, as a key cancer stem cell marker in tumor progression[J]. Gene, 2022, 827: 146448-57.
- [8] Deng L, Zhang XP, Xiang XC, et al. NANOG promotes cell proliferation, invasion, and stemness via IL-6/STAT3 signaling in esophageal squamous carcinoma[J]. Technol Cancer Res Treat, 2021, 20: 11038492-56.
- [9] Serej ZA, Ebrahimi A, Kazemi T, et al. *NANOG* gene suppression and replacement of let-7 modulate the stemness, invasion, and apoptosis in breast cancer[J]. Gene, 2021, 801: 145844-53.
- [10] Vasefifar P, Najafi S, Motafakkerzad R, et al. Targeting Nanog expression increased Cisplatin chemosensitivity and inhibited cell migration in Gastric cancer cells[J]. Exp Cell Res, 2023, 429(2): 113681-8.
- [11] Samantaray S, Sharma R, Chattopadhyaya TK, et al. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(1): 37-44.
- [12] Ma K, Zhang C, Li WY. Gamabufotalin suppressed osteosarcoma stem cells through the TGF- $\beta$ /periostin/PI3K/AKT pathway[J]. Chem Biol Interact, 2020, 331: 109275-83.
- [13] 杨 铭, 李 梅, 孙 畅, 等. T $\beta$ R1和p-Smad2/3蛋白在哈萨克族食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2023, 52(2): 239-44.
- [14] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [15] Nimmakayala RK, Leon F, Rachagani S, et al. Metabolic programming of distinct cancer stem cells promotes metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Oncogene, 2021, 40(1): 215-31.
- [16] Giri A, Kar S. Interlinked bi-stable switches govern the cell fate commitment of embryonic stem cells[J]. FEBS Lett, 2024, 598(8): 915-34.
- [17] Rodrigues MFSD, Xavier FCA, Andrade NP, et al. Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma[J]. Head Neck, 2018, 40(8): 1759-73.
- [18] Abdelbary AM, Atwa HA, Elfaragy OM, et al. Prognostic implications of CD24, SOX2, and nanog expression in invasive urothelial carcinoma[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2023, 31(6): 421-8.
- [19] 李秀娟, 赵轶峰, 李明霞, 等. 食管鳞癌组织Nanog表达临床意义分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(24): 1962-5.
- [20] Stillebroer AB, Mulders PF, Boerman OC, et al. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy[J]. Eur Urol, 2010, 58(1): 75-83.
- [21] Kashyap T, Nath N, Mishra P, et al. Pluripotency transcription factor Nanog and its association with overall oral squamous cell carcinoma progression, cisplatin-resistance, invasion and stemness acquisition [J]. Head Neck, 2020, 42(11): 3282-94.
- [22] Alaseem A, Alhazzani K, Dondapati P, et al. Matrix Metalloproteinases: a challenging paradigm of cancer management[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 56: 100-15.
- [23] Knapinska AM, Fields GB. The expanding role of MT1-MMP in cancer progression[J]. Pharmaceuticals, 2019, 12(2): 77-85.
- [24] Gobin E, Bagwell K, Wagner J, et al. A pan-cancer perspective of matrix metalloproteinases (*MMP*) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 581-7.
- [25] Liu CM, Sheng MX, Lin LH, et al. NANOG regulates the proliferation of PCSCs via the TGF- $\beta$ /SMAD pathway[J]. Open Med, 2020, 15(1): 841-9.
- [26] Muscella A, Vetrugno C, Cossa LG, et al. TGF- $\beta$ 1 activates RSC96 Schwann cells migration and invasion through MMP-2 and MMP-9 activities[J]. J Neurochem, 2020, 153(4): 525-38.

(编辑: 林 萍)