

基于 YTHDF2 介导凋亡相关因子降解途径研究牙龈卟啉单胞菌协助食管癌免疫逃逸

杨 泽, 张秀森, 张旭东, 柳 颖, 张嘉诚, 原 翔

河南科技大学临床医学院//河南科技大学第一附属医院, 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

摘要:目的 探讨牙龈卟啉单胞菌(Pg)感染食管癌细胞后对 YTHDF2 及凋亡相关因子(Fas)的影响, 阐明其促进免疫逃逸可能的调控机制。方法 运用免疫组织化学法及 Western blot 法检测 Pg 感染食管癌与 YTHDF2 及 Fas 表达变化; 运用免疫共沉淀验证 YTHDF2 和 Fas 蛋白间的相互作用; 将体外培养的 Pg 感染后的 KYSE150 细胞通过慢病毒转染分为对照组(转染 si-NC)和实验组(转染 si-YTHDF2), Western blotting 检测两组细胞中 YTHDF2、组织蛋白酶 B(CTSB) 及 Fas、FasL 蛋白的表达水平; 对 Pg 感染的 KYSE150 细胞用组织蛋白酶抑制剂(E64)进行处理, Western blotting 分别检测抑制剂处理前后 YTHDF2、CTSB、Fas 及 FasL 蛋白的表达变化情况; Pg 感染前后及 E64 处理的 KYSE150 细胞与人外周血单个核细胞(PBMC)共培养, 运用流式细胞术检测 T 细胞相关效应分子的表达情况。结果 免疫组化法及 Western blotting 结果显示, Pg 感染后的组织或细胞中 YTHDF2 的表达增强, 而 Fas 表达减弱($P < 0.001$); 免疫共沉淀结果显示, YTHDF2 和 Fas 之间可直接相互作用; Western blotting 结果显示, si-YTHDF2 组细胞中 CTSB 表达量减低, 而 Fas 及 FasL 的表达量高于 si-NC 组($P < 0.001$); 用 E64 处理细胞后, CTSB 表达减弱, YTHDF2 表达无影响, 而 Fas 及 FasL 的表达增强; 流式细胞术结果显示, 与 PBMC 共培养的细胞中, Granzyme B 及 Ki67 表达由强到弱分别为 Pg 阴性、Pg 阳性+E64、Pg 阳性, 而 PD-1 表达情况相反($P < 0.001$)。结论 Pg 感染依赖 YTHDF2 调节 Fas 的表达, 协助食管癌免疫逃逸, 从而促进食管癌发生发展, 表明 YTHDF2 可能是一个新的调控食管癌免疫逃逸的关键分子。

关键词: 食管鳞状细胞癌; 牙龈卟啉单胞菌; m⁶A 甲基化阅读蛋白 YTHDF2; 凋亡相关因子; 肿瘤免疫

Porphyromonas gingivalis infection facilitates immune escape of esophageal cancer by enhancing YTHDF2-mediated Fas degradation

YANG Ze, ZHANG Xiuse, ZHANG Xudong, LIU Ying, ZHANG Jiacheng, YUAN Xiang

College of Clinical Medicine/First Affiliated Hospital, Henan University of Science and Technology, State Key Laboratory of Esophageal Cancer Prevention and Treatment, Henan Provincial Key Laboratory of Microbiome and Esophageal Cancer Prevention and Treatment, Henan Provincial Key Laboratory of Cancer Epigenetics, Luoyang 471003, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) infection on immune escape of esophageal cancer cells and the role of YTHDF2 and Fas in this regulatory mechanism. **Methods** We examined YTHDF2 and Fas protein expressions in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues with and without Pg infection using immunohistochemistry and in Pg-infected KYSE150 cells using Western blotting. The interaction between YTHDF2 and Fas was investigated by co-immunoprecipitation (Co-IP). Pg-infected KYSE150 cells with lentivirus-mediated YTHDF2 knockdown were examined for changes in expression levels of YTHDF2, cathepsin B (CTSB), Fas and FasL proteins, and the effect of E64 (a cathepsin inhibitor) on these proteins were observed. After Pg infection and E64 treatment, KYSE150 cells were co-cultured with human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and the expressions of T cell-related effector molecules were detected by flow cytometry. **Results** ESCC tissues and cells with Pg infection showed significantly increased YTHDF2 expression and lowered Fas expression. The results of Co-IP demonstrated a direct interaction between YTHDF2 and Fas. In Pg-infected KYSE150 cells with YTHDF2 knockdown, the expression of CTSB was significantly reduced while Fas and FasL expressions were significantly increased. E64 treatment of KYSE150 cells significantly decreased the expression of CTSB without affecting YTHDF2 expression and obviously increased Fas and FasL expressions. Flow cytometry showed that in Pg-infected KYSE150 cells co-cultured with PBMCs, the expressions of Granzyme B and Ki67 were significantly decreased while PD-1 expression was significantly enhanced. **Conclusion** Pg infection YTHDF2-dependently regulates the expression of Fas to facilitate immune escape of esophageal cancer and thus promoting cancer progression, suggesting the key role of YTHDF2 in regulating immune escape of esophageal cancer.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma; *Porphyromonas gingivalis*; m⁶A methylated reading protein YTHDF2; Fas; tumor immunity

食管癌是最常见且最致命的恶性肿瘤之一, 是全球

癌症相关死亡的第6大原因^[1]。食管癌早期缺乏特异性症状或体征, 因此总体预后极差, 5年总生存率仅15%左右。食管癌按照组织学类型主要分为鳞状细胞癌(ESCC)和腺癌, 其中ESCC约占80%以上^[2]。食管癌的病因和发病机制可能与饮食、地域、遗传、感染等多种因素相关^[3, 4], 我国ESCC的发生发展可能具有其独特的高

收稿日期: 2023-11-18

基金项目: 河南省科学技术厅-优秀青年科学基金(222300420041); 河南省教育厅-河南省科技攻关项目(242102310146)

作者简介: 杨 泽, 在读硕士研究生, E-mail: 877417588@qq.com

通信作者: 原 翔, 博士, 副教授, 硕士生导师, E-mail: 13283677@qq.com

危因素及分子机制^[5,6],但目前尚未被完全阐明。因此,需要进一步对食管癌相关的分子机制进行深入研究,探索可能存在的新型特异性生物标志物,为食管癌的诊治提供新策略。

人体消化道存在多种微生物定植,以细菌为主,维持消化道微生物菌群平衡对消化道健康有重要作用。牙龈卟啉单胞菌(Pg)作为牙周炎的标志性病原微生物,其特性包括:破坏口腔微环境稳态、调控细胞增殖或凋亡、激活上皮细胞的转化、促进血管生成、抑制宿主免疫系统以及产生致癌代谢物等^[7]。有研究表明,Pg在食管中定植并且Pg感染与食管癌的发生发展密切相关;Pg感染能够通过FimA等毒力因子通过多种途径协助肿瘤细胞免疫逃逸,进一步促进食管癌细胞增殖、迁移、侵袭和转移能力^[8,9]。

N6-甲基腺苷(m⁶A)为真核生物mRNA最常见、最丰富的转录后修饰,参与RNA的剪接、转录、翻译和降解等各种代谢过程^[10]。研究表明,异常的m⁶A甲基化及其关键蛋白的表达与多种恶性肿瘤发生和进展过程密切相关^[11]。YTHDF为甲基阅读器蛋白,可与m⁶A特异性结合选择性调节RNA的代谢^[12]。YTH N6-甲基腺苷RNA结合蛋白2(YTHDF2)是m⁶A修饰的关键性蛋白,已在多种恶性肿瘤的文献中报道^[13]。研究发现,m⁶A甲基化阅读器蛋白YTHDF2能够调控肿瘤相关巨噬细胞的抗肿瘤免疫,且在CD8⁺T细胞的参与下,YTHDF2显著降低了肿瘤细胞的先天性和适应性免疫^[14]。有研究表明,Pg能够通过RNA甲基化等表观遗传修饰途径促进多种口腔炎症性疾病的进展^[15]。本团队前期研究表明,Pg感染可促进食管癌细胞逃避宿主的免疫监视^[9],然而Pg感染后肿瘤细胞逃避免疫的能力是否与m⁶A甲基化阅读器蛋白相关目前相关尚未有报道。因此Pg感染通过m⁶A甲基化阅读器蛋白YTHDF2途径影响肿瘤免疫的相关机制有待进一步阐明。

凋亡相关因子(Fas)属于肿瘤坏死因子受体超家族,是一种死亡受体,与配体FasL结合后能够介导细胞的凋亡,在维持免疫微环境稳态等过程中发挥重要作用^[16]。Fas的异常表达与多种免疫相关性肿瘤和疾病的发病机制存在密切联系,有研究发现抑制癌症细胞中Fas的表达能够诱导CD8⁺T细胞凋亡,降低肿瘤细胞对获得性免疫反应的敏感性^[17]。FasL高表达的肿瘤细胞可以通过Fas/FasL相互作用来传递凋亡信号,促进肿瘤浸润淋巴细胞的凋亡,最终导致抗肿瘤免疫逃逸^[18]。推测在Pg感染的食管癌中可能也存在这种情况。

本研究通过检测Pg感染食管癌后对YTHDF2的影响,以及YTHDF2与Fas之间的相互作用,阐明Pg感染对CD8⁺T细胞免疫功能的抑制作用,初步探索Pg感染与甲基化阅读器蛋白YTHDF2的相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料及主要试剂

1.1.1 组织样本 纳入2022年9月~2023年5月在我院被诊断为食管鳞癌并进行手术的患者病理组织。本研究经医院伦理委员会的批准(伦理审批编号:2021-0165),患者均签署知情同意书。术中切除的肿瘤组织用多聚甲醛固定后蜡块包埋以备用。

1.1.2 实验主要试剂 ATCC 33277来源于本实验室;KYSE150细胞系(上海博古生物细胞所);细胞培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、青-链霉素、免疫组织化学染色试剂盒、PBS磷酸盐缓冲液(北京索莱宝科技有限公司);PAGE凝胶制备试剂盒(10%)、e-ECL显影液(雅酶公司);Anti-YTHDF2抗体、Anti-CTSB抗体(Thermo Fisher Scientific);Anti-Fas抗体、Anti-FasL抗体(Abcam);Pg抗体 diatheva(上海玉博生物科技有限公司);PVDF膜(milipore Milipore);倒置显微镜(Nikon);全自动酶标仪、细胞培养箱(Thermo);凝胶成像分析仪(Bio-Rad);荧光共聚焦显微镜(ZEISS);厌氧培养箱(Shellab);流式细胞仪(CyTek)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及Pg培养 KYSE150细胞培养:含10%胎牛血清和1%双抗的RPMI 1640完全培养基,放置于含有5% CO₂的37℃恒温培养箱中培养,必要时进行传代或冻存处理。Pg标准菌株ATCC 33277于37℃厌氧条件下培养,每次感染细胞前,采用革兰染色后进行形态学检测及16S rDNA特异扩增检查确定菌株未发生变异及其它细菌污染。

1.2.2 Pg感染细胞 待被感染细胞生长至80%以上时,PBS清洗细胞2次,加入1 mL胰蛋白酶置于恒温培养箱中消化5 min,加入2 mL RPMI 1640培养基终止消化。消化后的细胞悬液离心、弃上清、重悬细胞。在细胞计数后向新的培养皿内加入(1~10)×10⁶ KYSE150细胞,于恒温培养箱中培养细胞至完全贴壁,弃去原细胞培养液,用PBS清洗细胞,加入RPMI 1640培养基。取生长期细菌感染细胞,培养Pg使其OD值达1.0~1.5,将Pg悬液以12 000 r/min转速离心10 min后用RPMI 1640重悬。按照预定的感染复数值在细胞培养基中加入相应数量的Pg,随后于恒温培养箱中培养3 d。3 d后收集细胞培养液并于4000 r/min条件下离心20 min,留取上清进一步使用0.22 μm孔径的滤器过滤,滤液置于-20℃冰箱保存。将体外培养的Pg感染后的KYSE150细胞通过慢病毒转染分为对照组(转染si-NC)和实验组(转染si-YTHDF2)。

1.2.3 免疫组织化学(IHC) 将包埋好的蜡块切片、烤片。依次将载玻片放入二甲苯、梯度酒精中各3 min脱蜡,3% H₂O₂中浸泡10 min,在清水中洗2次,再置入柠

柠檬酸缓冲液中,放入微波炉煮至沸腾,取出载玻片冷却至室温。滴加血清封闭液孵育 30 min,加入适量一抗 4 °C 孵育过夜,室温孵育二抗。加显色剂,用清水冲洗一段时间后,浸泡于苏木精中染色。载玻片依次放入梯度酒精、二甲苯中脱水,晾干后中性树胶封片。

1.2.4 Western blotting 配制细胞裂解液裂解后提取蛋白,取少量样品用 BCA 法测蛋白浓度,其余蛋白按照测定浓度加入 Loading Buffer,95 °C 煮 10 min。制备浓缩胶,等质量蛋白上样后进行电泳,转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗膜。根据实验需要一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜,室温孵育二抗 1 h, TBST 洗膜。ECL 方法进行曝光显影。

1.2.5 免疫共沉淀 (Co-IP) 在 293T 细胞中,用 Myc-YTHDF2 和编码 HA-Fas 的表达质粒进行转染。细胞加入适量 RIPA 细胞裂解缓冲液,置于冰上 30 min,4 °C 最大转速离心 30 min 后取上清。取少量裂解液以备分析 (Input), 剩余裂解液分别使用 Myc 和 HA 抗体与磁珠结合后共同孵育得到免疫沉淀复合物。剩余裂解液中加入 1 μg 相应抗体制成混合液,4 °C 缓慢摇晃孵育过夜,混合液中再加入 10 μL 预处理(裂解缓冲液洗 3 次,每次 3000 r/min,离心 3 min)过的 protein A 琼脂糖珠,摇晃孵育 2 h。4 °C 3000 r/min 离心 3 min,吸去上清,裂解缓冲液洗 3 次,加入 SDS 加样缓冲液,煮沸 5 min。最终所得样品和 Input 均用 Western blotting 检测。

1.2.6 流式细胞术 人外周血和 1640 培养基按照 1:1 的比例加入离心管内,分层加入适量淋巴细胞分离培养基 (FicollPaque),500 g 离心 25 min,吸取中间的白色薄膜层,即为 PBMC。PBS 洗涤 2 次,调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。与 KYSE150 细胞按 2:1 的比例共培养 48 h 后再次提取 PBMC。加入适量细胞染色缓冲液重悬细胞并转移至流式管,加入流式抗体,4 °C 避光孵育 30 min,细胞染色缓冲液洗涤,离心弃上清,再加入适量细胞染色缓冲液重悬细胞,上机进行检测。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,使用 GraphPad Prism 7 软件绘图。实验数据以均数±标准差表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 食管鳞癌中 Pg 感染与 YTHDF2 和 Fas 蛋白表达变化的相关性

牙龈卟啉单胞菌感染 ESCC 组织的免疫组化结果显示 Pg 在肿瘤细胞的胞浆染色 (图 1A、B)。免疫组化结果显示,与 Pg 阴性的 ESCC 的组织相比,Pg 阳性的组织中 YTHDF2 的表达量增强,而 Fas 的表达量减弱

(图 1C~F, $P < 0.001$)。Western blot 结果显示,Pg 阳性的 KYSE150 细胞内 YTHDF2 的表达量增加,相反的,Fas 的表达量减弱 (图 1G~I, $P < 0.001$)。

2.2 YTHDF2 可与 Fas 相互作用

Co-IP 实验结果显示,外源性 YTHDF2 能够与外源性 Fas 相互结合形成复合物 (图 2)。

2.3 YTHDF2 介导 Fas 蛋白通过组织蛋白酶途径降解

Western blotting 结果显示,相比对照组,实验组中 YTHDF2 蛋白的表达量减少,CTSB 的表达量也减少,而 Fas、FasL 的表达量增加 (图 3A、B, $P < 0.001$)。Western blot 结果显示,在 E64 处理后,YTHDF2 表达量不变,CTSB 表达量减弱,而 Fas 和 FasL 表达量增强 (图 3C、D, $P < 0.001$)。

2.4 Pg 依赖 YTHDF2-Fas 途径抑制食管癌中 T 细胞的免疫效应

流式细胞术结果显示,Pg 感染组的 Granzyme B、Ki-67 的表达减弱,PD-1 表达增强 ($P < 0.001$),但是经 E64 处理可部分恢复 Granzyme B 和 Ki-67 的表达水平 (图 4)。

3 讨论

病原微生物具有复杂多样的生物功能,是肿瘤内在微环境的重要组成部分^[19]。大多数病原微生物并不能直接导致癌症,但它们通常会影响宿主正常的免疫功能,协助参与癌症的发生发展过程^[20]。牙龈卟啉单胞菌被认为是慢性牙周炎的关键病原体,可导致微环境失调和异常的免疫反应^[21]。有研究表明,牙龈卟啉单胞菌能够通过 PGN 诱导 PD-L1 上调,改变肿瘤免疫微环境来促进前列腺癌的发展和进展^[22];而在结直肠癌中,牙龈卟啉单胞菌能够侵入肿瘤细胞并激活 MAPK/ERK 信号通路,从而促进结直肠癌细胞的增殖^[23]。Pg 感染可导致多种恶性肿瘤肿瘤进展,但目前没有研究阐述牙龈卟啉单胞菌与 m⁶A 甲基化的相关机制。本研究主要从 Pg 感染通过 m⁶A 甲基化阅读蛋白 YTHDF2 途径协助 ESCC 细胞免疫逃避,进而促进食管癌进展这一角度阐明相关机制。

虽然已有研究表明,牙龈卟啉单胞菌可能通过 miR-194/GRHL3/PTEN/Akt 信号轴促进 ESCC 的增殖和迁移^[24];也可能通过促进 IFNGR1 在 122 位点的棕榈酰化下调 IFNGR1 的蛋白表达,从而增强 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭^[25];或者通过 GSK3β 介导的 mtOXPHOS 促进 ESCC 的进展^[26]。研究表明 YTHDF2 作为 m⁶A 甲基化的关键阅读蛋白,通过调控 mRNA 的翻译及降解等导致 m⁶A 甲基化水平发生改变,从而影响下游分子的表达水平^[27]。本研究发现,Pg 阳性的 ESCC 肿瘤组织或细胞中,YTHDF2 表达增高。这表明

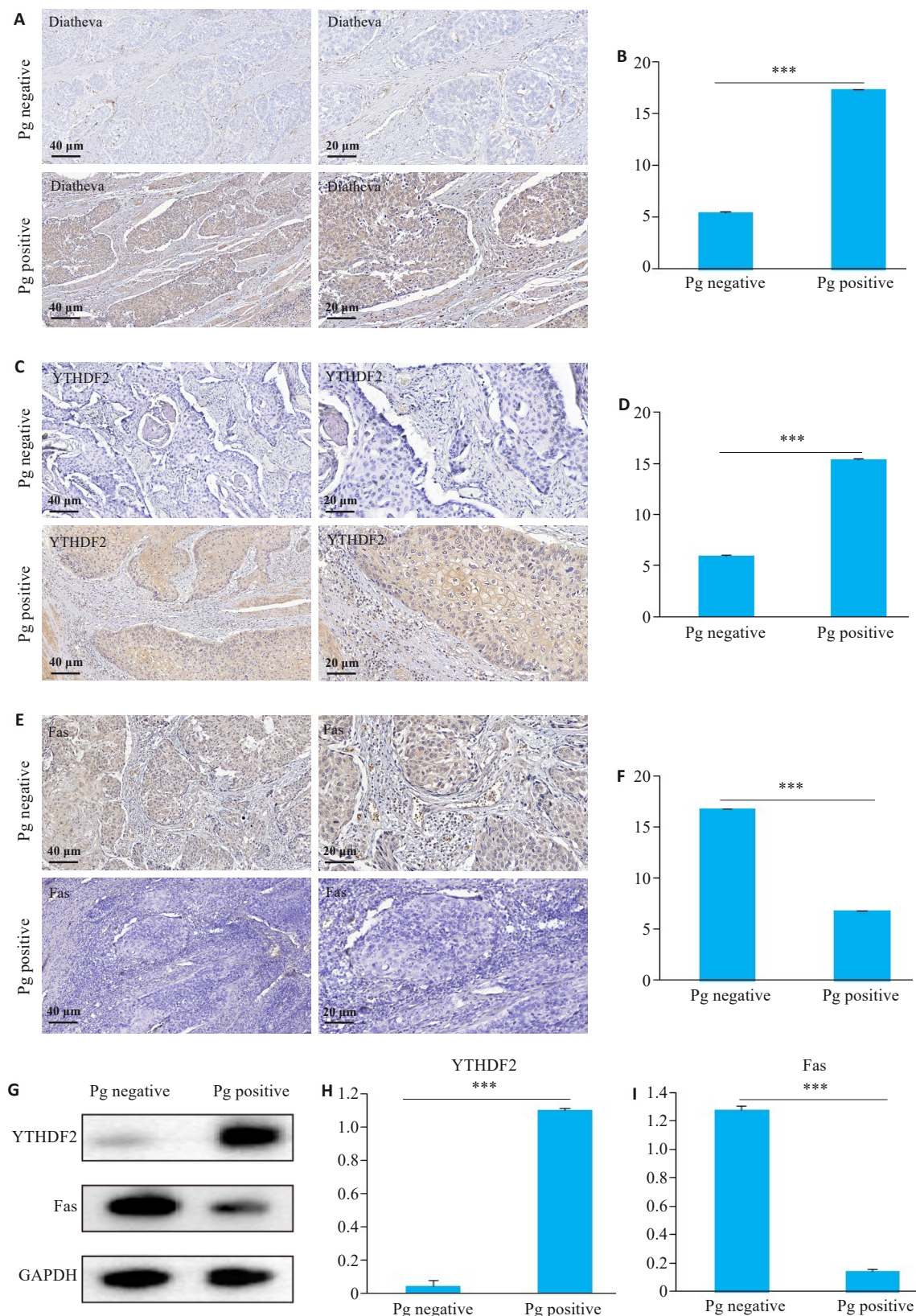


图1 食管鳞癌中Pg感染与YTHDF2和Fas蛋白表达变化的相关性

Fig. 1 Expressions of YTHDF2 and Fas protein in esophageal squamous cell carcinoma tissues with and without Pg infection. A, C, E: Immunohistochemical detection of the expression of diatheva (Pg antibody), YTHDF2, and Fas in Pg-positive or Pg-negative ESCC tissues. B, D, F: Statistical charts of immunohistochemical results scores. G-I: Western blotting for detecting YTHDF2 and Fas protein expressions in KYSE150 cells with and without Pg infection. *** $P < 0.001$.

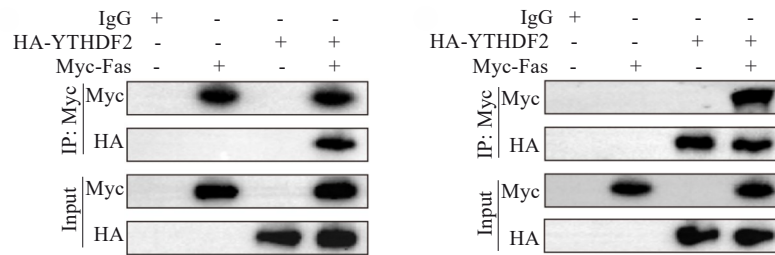


图2 YTHDF2可与Fas相互作用

Fig.2 Co-immunoprecipitation for detecting interaction between YTHDF2 and Fas proteins.

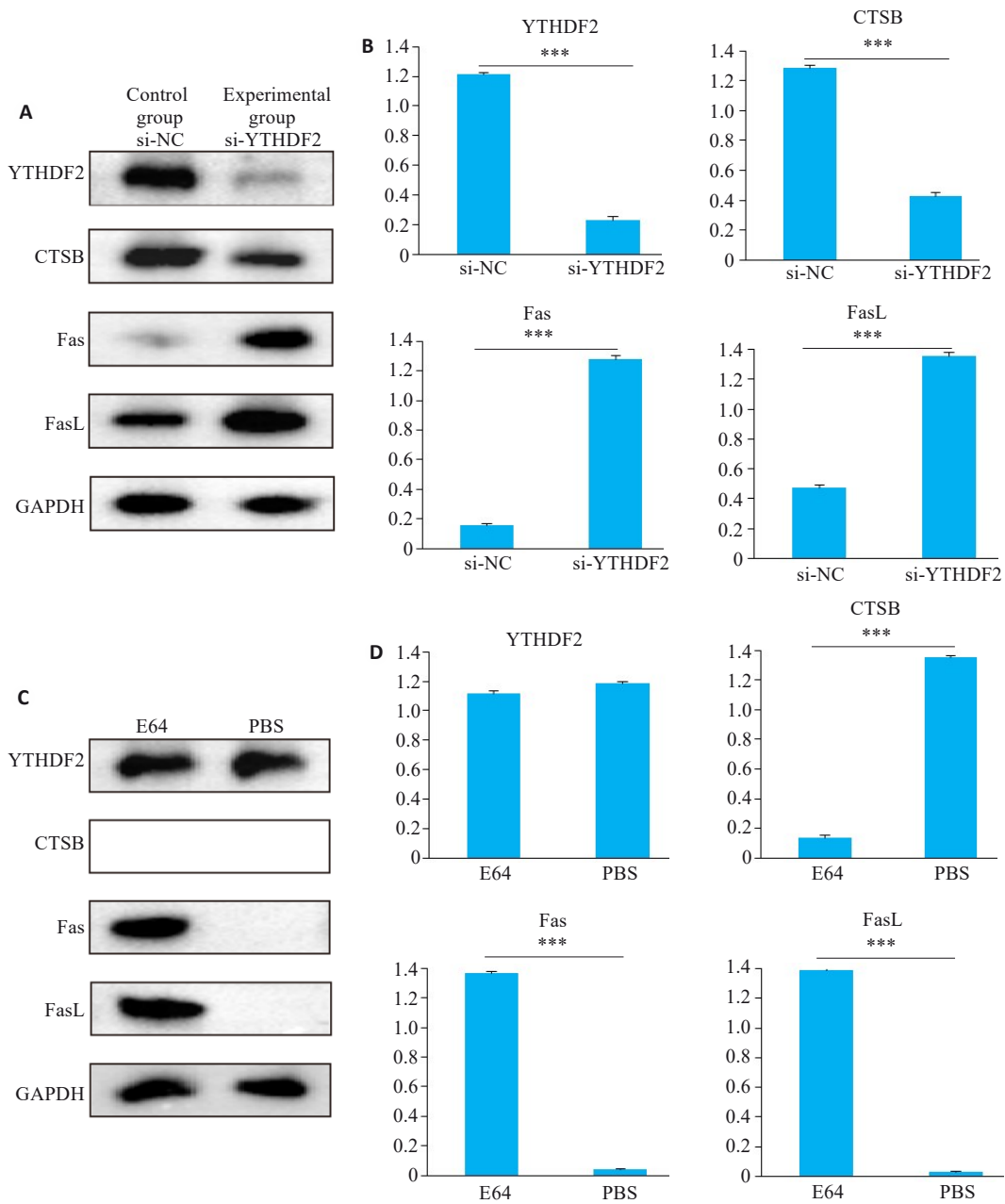


图3 YTHDF2介导Fas蛋白通过组织蛋白酶途径降解

Fig.3 YTHDF2 mediates Fas protein degradation through the tissue protease pathway. **A, B**: Western blotting for detecting changes in YTHDF2, CTSB, Fas, and FasL protein expressions in KYSE150 cells after lentivirus transfection. **C, D**: Western blotting for detecting changes in protein expression of CTSB, YTHDF2, Fas, and FasL in KYSE150 cells after treatment with the tissue protease inhibitor (E64). *** $P < 0.001$.

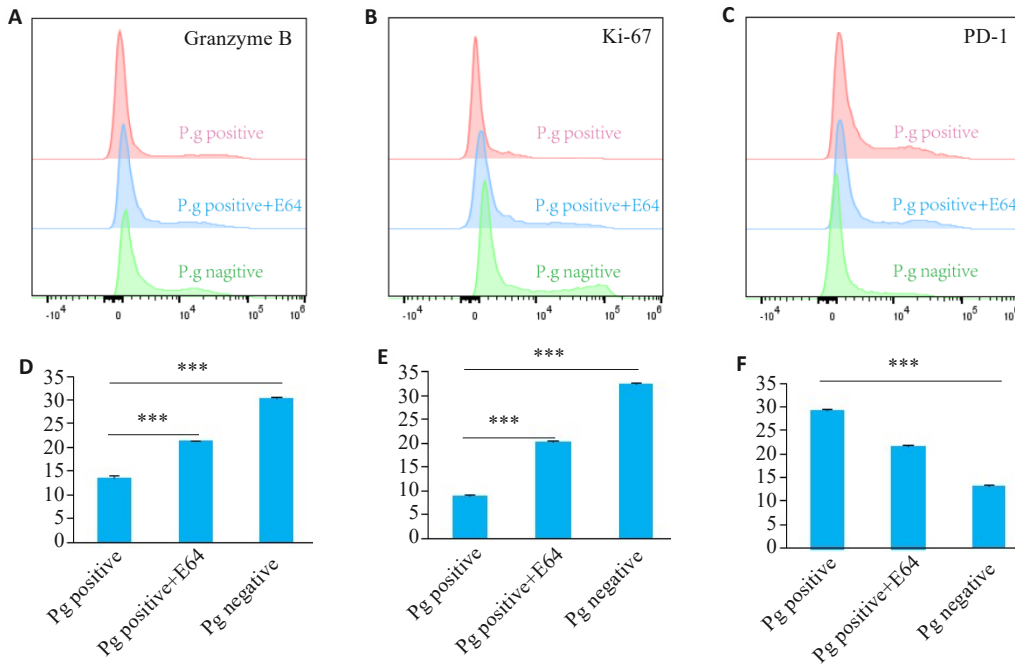


图4 P.g依赖YTHDF2-Fas途径抑制食管癌中T细胞的免疫效应

Fig. 4 Immunomodulatory effect of P.g infection mediated by the YTHDF2-Fas pathway on T cells in esophageal cancer. A-C: Flow cytometric analysis of the effects of P.g infection on expressions of Granzyme B, Ki-67, and PD-1 in T cells co-cultured with KYSE150 cells. D-F: Statistical charts of flow cytometry results. *** $P < 0.001$.

P.g可能通过上调YTHDF2介导其依赖m⁶A甲基化修饰途径来促进ESCC的进展,需要进一步研究P.g感染能否通过甲基化阅读蛋白影响m⁶A甲基化水平的变化。

多种肿瘤细胞表面的Fas表达水平减低,通过与配体间的相互作用,诱导细胞凋亡,进一步逃避免疫系统监视,但其潜在的机制尚不明确^[28]。本研究发现YTHDF2与Fas能直接相互作用,并且YTHDF2高表达能够诱导Fas降解。我们发现P.g感染ESCC后YTHDF2高表达,而Fas低表达。CTSB是一种定位于溶酶体的半胱氨酸蛋白酶,CTSB与细胞中溶酶体和自噬相关蛋白的表达密切相关^[29]。因此,我们猜测这二者呈现负相关的原因可能是YTHDF2诱导自噬途径增强。自噬途径是将各种细胞代谢产物输送到溶酶体进行降解或再循环的主要机制^[30]。有研究显示,YTHDF2通过调控体细胞重编程介导mRNA降解,促进体细胞相关基因的自噬清除^[31],证明了YTHDF2能够调控mRNA代谢过程,促进细胞代谢分子通过自噬途径降解。本研究通过实验进一步证明了P.g感染高表达YTHDF2能够介导Fas通过自噬途径降解。此外,我们还利用肿瘤细胞和PBMC共培养,通过流式细胞术检测证明P.g感染ESCC后可以显著减弱T细胞的增殖和杀伤作用,促进食管癌免疫逃逸。

牙龈卟啉单胞菌可释放多种毒力因子,包括菌毛、荚膜、蛋白酶和外膜囊泡等,这些毒力因子的产生能够

使细菌更好地在宿主体内存活、繁殖,并且其致病性在很大程度上与干扰宿主的免疫功能有关^[32,33]。菌毛蛋白FimA是牙龈卟啉单胞菌的重要毒力因子,在促进细菌黏附和入侵宿主细胞、参与生物膜形成以及引起宿主细胞的免疫炎症反应等多种过程中发挥重要作用^[34]。有研究表明,P.g感染后其毒力因子FimA的基因表达在上消化道肿瘤中呈现上高下低的分布特征^[35]。有研究显示,FimA缺失可能降低菌体间黏附,使侵入细胞内的细菌数目减少,刺激肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力降低;这进一步证明可能存在FimA介导P.g从而促进ESCC进展的相关机制,是P.g促肿瘤作用的潜在分子靶点^[36]。因此,我们推测P.g在调控YTHDF2高表达的过程中,可能通过FimA等致病毒力因子,这需要进一步研究证实。

综上所述,本研究初步提出P.g感染可能通过m⁶A甲基化阅读蛋白YTHDF2途径介导Fas降解,并进一步抑制T细胞杀伤能力,协助食管癌产生免疫逃逸。

参考文献:

[1] 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.
 [2] Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA, et al. Oesophageal carcinoma [J]. Lancet, 2013, 381(9864): 400-12.
 [3] Zhou JC, Sun KX, Wang SM, et al. Associations between cancer

- family history and esophageal cancer and precancerous lesions in high-risk areas of China[J]. *Chin Med J*, 2022, 135(7): 813-9.
- [4] Xie SH, Lagergren J. Risk factors for oesophageal cancer[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2018, 36/37: 3-8.
- [5] Cancer Genome Atlas Research Network, Analysis Working Group: Asan University, BC Cancer Agency, et al. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma[J]. *Nature*, 2017, 541(7636): 169-75.
- [6] Deng JY, Chen H, Zhou DZ, et al. Comparative genomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma between Asian and Caucasian patient populations[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1533.
- [7] Lamont RJ, Fitzsimonds ZR, Wang HZ, et al. Role of *Porphyromonas gingivalis* in oral and orodigestive squamous cell carcinoma[J]. *Periodontol 2000*, 2022, 89(1): 154-65.
- [8] Gao SG, Yang JQ, Ma ZK, 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.
- [9] Yuan X, Liu YW, Li GF, et al. Blockade of immune-checkpoint B7-H4 and lysine demethylase 5B in esophageal squamous cell carcinoma confers protective immunity against *P. gingivalis* infection[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(9): 1440-56.
- [10] Zhuang HZ, Yu B, Tao D, et al. The role of m6A methylation in therapy resistance in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 91.
- [11] Lan Q, Liu PY, Haase J, et al. The critical role of RNA m6A methylation in cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(7): 1285-92.
- [12] Zaccara S, Jaffrey SR. A Unified Model for the Function of YTHDF Proteins in Regulating m(6)A-Modified mRNA[J]. *Cell*, 2020, 181(7): 1582-95.
- [13] Wang X, Zhao B, Roundtree I, et al. N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency[J]. *Cell*, 2015, 161(6): 1388-99.
- [14] Ma SB, Sun BF, Duan SQ, et al. YTHDF2 orchestrates tumor-associated macrophage reprogramming and controls antitumor immunity through CD8⁺ T cells[J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(2): 255-66.
- [15] Huang J, Zhou Y. Emerging role of epigenetic regulations in periodontitis: a literature review[J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(4): 2162-83.
- [16] Lagunas-Rangel FA. Fas (CD95)/FasL (CD178) system during ageing[J]. *Cell Biol Int*, 2023, 47(8): 1295-313.
- [17] Mahadevan KK, McAndrews KM, LeBleu VS, et al. KRAS(G12D) inhibition reprograms the microenvironment of early and advanced pancreatic cancer to promote FAS-mediated killing by CD8⁺ T cells[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(9): 1606-20.
- [18] Chiu HY, Sun GH, Chen SY, et al. Pre-existing fas ligand (FasL) in cancer cells elicits tumor-specific protective immunity, but delayed induction of FasL expression after inoculation facilitates tumor formation[J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(9): 705-14.
- [19] Xie YF, Xie F, Zhou XX, et al. Microbiota in tumors: from understanding to application[J]. *Adv Sci*, 2022, 9(21): e2200470.
- [20] Sepich-Poore GD, Zitvogel L, Straussman R, et al. The microbiome and human cancer[J]. *Science*, 2021, 371(6536): eabc4552.
- [21] Singhrao SK, Harding A, Simmons T, et al. Oral inflammation, tooth loss, risk factors, and association with progression of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 42(3): 723-37.
- [22] Groeger S, Wu F, Wagenlehner F, et al. PD-L1 up-regulation in prostate cancer cells by *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 935806.
- [23] Mu WX, Jia YQ, Chen XB, 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.
- [24] Liang GF, Wang HJ, 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.
- [25] Shen L, Zhang D, Gao S. Effect of infection on IFNGR1 palmitoylation in esophageal cancer cells [J]. *J South Med Uni*, 2023, 43: 1155-63.
- [26] Liu YW, Zhou FY, Yang HJ, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes malignancy and chemo-resistance via GSK3 β -mediated mitochondrial oxidative phosphorylation in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Transl Oncol*, 2023, 32: 101656.
- [27] Dixit D, Prager BC, Gimble RC, et al. The RNA m6A reader YTHDF2 maintains oncogene expression and is a targetable dependency in glioblastoma stem cells[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(2): 480-99.
- [28] Sharma S, Carmona A, Skowronek A, et al. Apoptotic signalling targets the post-endocytic sorting machinery of the death receptor Fas/CD95[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3105.
- [29] Man SM, Kanneganti TD. Regulation of lysosomal dynamics and autophagy by CTSB/cathepsin B[J]. *Autophagy*, 2016, 12(12): 2504-5.
- [30] Debnath J, Gammoh N, Ryan KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(8): 560-75.
- [31] Liu JD, Gao MW, Xu SY, et al. YTHDF2/3 are required for somatic reprogramming through different RNA deadenylation pathways[J]. *Cell Rep*, 2020, 32(10): 108120.
- [32] Zheng SW, Yu SW, Fan XM, et al. *Porphyromonas gingivalis* survival skills: immune evasion[J]. *J Periodontol Res*, 2021, 56(6): 1007-18.
- [33] Li C, Yu R, Ding YM. Association between *Porphyromonas Gingivalis* and systemic diseases: focus on T cells-mediated adaptive immunity[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 1026457.
- [34] Xu WZ, Zhou W, Wang HZ, et al. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2020, 120: 45-84.
- [35] Yuan X, Liu YW, Kong JY, et al. Different frequencies of *Porphyromonas gingivalis* infection in cancers of the upper digestive tract[J]. *Cancer Lett*, 2017, 404: 1-7.
- [36] 阮豪杰, 程维刚, 焦叶林, 等. 菌毛素介导牙龈卟啉单胞菌对食管鳞癌促进作用[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2022, 42(4): 275-80.