

# AGR2 通过调控 TGF-β/SMAD 信号通路 对鼻咽癌细胞迁移和侵袭的影响

金辉, 黄文霞, 王珍, 吴龙军, 梁耕田

(武汉市第三医院 耳鼻咽喉科, 湖北 武汉 430060)

**摘 要:** **目的** 探讨前梯度蛋白 2 (AGR2) 调控转化生长因子-β (TGF-β)/信号转导蛋白 (SMAD) 信号通路对鼻咽癌 (NPC) 细胞迁移和侵袭的影响。**方法** 体外培养人正常鼻咽上皮细胞 (NP69) 和 NPC 细胞 (5-8F、6-10B、CNE-1), 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 测定细胞中 AGR2 mRNA 表达。将 5-8F 细胞随机分为对照组 (Control 组)、转染阴性对照组 (sh-NC 组)、敲低 AGR2 组 (sh-AGR2 组)、敲低 AGR2 + TGF-β 信号通路激活剂 SRI-011381 组 (sh-AGR2 + SRI-011381 组)。qRT-PCR 及蛋白质印迹 (Western blot) 测定各组 AGR2 的表达; CCK8 和克隆形成测定细胞增殖; 划痕实验测定细胞迁移; Transwell 实验测定细胞侵袭; 流式细胞仪测定细胞凋亡; Western blot 测定细胞中增殖细胞核抗原 (PCNA)、基质金属蛋白酶 (MMP)-2、MMP-9、TGF-β1、磷酸化 SMAD 家族成员 2/SMAD 家族成员 2 (p-SMAD2/SMAD2) 表达。**结果** 与 NP69 细胞相比, NPC 细胞中 AGR2 mRNA 表达升高; 与 Control 组或 sh-NC 组相比, sh-AGR2 组细胞的 OD450、克隆数、划痕愈合率、侵袭数、PCNA、MMP-2、MMP-9、TGF-β1、p-SMAD2/SMAD2 表达水平下降, 细胞凋亡率升高 ( $P < 0.05$ ); 与 sh-AGR2 组相比, sh-AGR2 + SRI-011381 组细胞的 OD450、克隆数、划痕愈合率、侵袭数、PCNA、MMP-2、MMP-9、TGF-β1、p-SMAD2/SMAD2 表达水平升高, 细胞凋亡率下降 ( $P < 0.05$ )。**结论** AGR2 在 NPC 细胞中表达水平升高, 进而促进 NPC 细胞的增殖、迁移及侵袭能力, 抑制细胞凋亡。这可能是通过调控 TGF-β/SMAD 信号通路实现。

**关 键 词:** 鼻咽癌; 前梯度蛋白 2; 转化生长因子-β/SMAD 信号通路; 细胞迁移; 细胞侵袭  
**中图分类号:** R739. 63

## The effect of AGR2 on the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by regulating the TGF-β/SMAD signaling pathway

JIN Hui, HUANG Wenxia, WANG Zhen, WU Longjun, LIANG Gengtian  
(Department of Otolaryngology, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of anterior gradient 2 (AGR2) on the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells by regulating the transforming growth factor-β (TGF-β)/SMAD signaling pathway. **Methods** Human normal nasopharyngeal epithelial cells (NP69) and NPC cells (5 - 8F, 6 - 10B, CNE-1) were cultured in vitro, and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of AGR2 mRNA in the cells. The 5 - 8F cells were randomly assigned into control group, sh-NC group, sh-AGR2 group, and sh-AGR2 + SRI-011381 group (sh-AGR2 + TGF-β signaling pathway activator SRI-011381). qRT-PCR and Western blot were applied to detect the transfection efficiency of AGR2. Cell proliferation was measured by CCK8 assay and colony formation assay. Cell migration was measured by scratch test. Transwell assay was used to measure cell invasion. Cell apoptosis was determined by flow cytometry. The protein expressions of PCNA, MMP-2, MMP-9, TGF-β1 and p-SMAD2/SMAD2 were detected by Western blot. **Results** Compared with NP69 cells, the AGR2 mRNA expression was elevated in NPC cells. Compared with the control group or sh-NC group, the OD450, clone number, scratch healing rate, invasion number, expression levels of PCNA, MMP-2, MMP-9, TGF-β1, and p-SMAD2/SMAD2 in the sh-AGR2

基金项目: 武汉市卫健委科研项目 (WX23Z04)。  
第一作者简介: 金辉, 男, 硕士, 主治医师。  
通信作者简介: 梁耕田, 男, 硕士, 主任医师。

group decreased, and the apoptosis rate was increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the sh-AGR2 group, the OD450, clone number, scratch healing rate, invasion number, expression levels of PCNA, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ 1, and p-SMAD2/SMAD2 in the sh-AGR2 + SRI-011381 group increased, and the apoptosis rate was decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression level of AGR2 is elevated in NPC cells, which in turn promotes the proliferation, migration and invasion abilities of NPC cells and inhibits cell apoptosis. This may be achieved by regulating the TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway.

**Keywords:** Nasopharyngeal carcinoma; Anterior gradient 2; Transforming growth factor- $\beta$ /SMAD signaling pathway; Cell migration; Cell invasion

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种起源于鼻咽部黏膜上皮的恶性肿瘤,最常发生于咽隐窝,具有种族和地理分布特征,这种癌症的发生不仅与环境因素相关,还受遗传因素的影响<sup>[1]</sup>。NPC的治疗方案需根据患者的具体情况制定,包括放疗、化疗、手术、免疫治疗、靶向治疗或联合治疗<sup>[2-3]</sup>。尽管这些技术取得了显著进步,但局部区域复发和远处转移仍是治疗失败的主要原因<sup>[4]</sup>。因此,全面了解参与癌症发展的分子机制,尤其是迁移与侵袭,对于探索 NPC 治疗策略极为重要。前梯度蛋白 2 (anterior gradient 2, AGR2) 是一种主要在人上皮细胞中表达的内质网驻留蛋白,由 175 个氨基酸序列组成,在肿瘤细胞生长、血管生成、抑制凋亡和组织转移中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。有研究证明,AGR2 在 NPC 中升高,与不良预后有关<sup>[6]</sup>。同时,AGR2 和转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 之间存在正反馈环路,促进癌细胞转移<sup>[7]</sup>。但 AGR2 与 TGF- $\beta$ 1 在 NPC 中的相互作用方式尚不清楚。TGF- $\beta$ 1 是 TGF- $\beta$  家族的一员,在肿瘤进展中起重要作用。越来越多的证据表明,TGF- $\beta$ 1 的高表达与肿瘤的侵袭性和不良预后相关<sup>[8]</sup>。此外,信号转导蛋白(drosophila mothers against decapentaplegic protein, SMAD)是 TGF- $\beta$  信号级联的核心蛋白。到目前为止,在哺乳动物中已发现 8 个 SMAD 家族成员,其中 SMAD2 可介导 TGF- $\beta$  信号通路的激活<sup>[9]</sup>。已有研究证实,抑制 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路的激活可抑制 NPC 细胞增殖、侵袭和转移<sup>[10]</sup>。因此,在本研究中以 NPC 细胞 5-8F 为研究对象,旨在探讨 AGR2 能否通过调控 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路对 NPC 细胞的迁移和侵袭产生影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人正常鼻咽上皮细胞(NP69)和 NPC 细胞(5-8F、6-10B、CNE-1)购自美国 ATCC; SRI-011381 (CAS:1629138-41-5)购自美国 MCE 公司;胰蛋白酶

(货号:T1300)、总 RNA 提取试剂盒(货号:R1200)、逆转录试剂盒(货号:T2240)、PCR 扩增试剂盒(货号:PC1320)购自北京索莱宝科技有限公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(货号:CW0022)、ECL 超敏发光液(货号:CW0049)购自江苏康为世纪生物科技有限公司;抗体 PCNA(货号:AF0239)、MMP-2(货号:AF5330)、MMP-9(货号:AF5228)、GAPDH(货号:AF7021)购自江苏亲科生物研究中心有限公司;AGR2(货号:13062)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;TGF- $\beta$ 1(货号:ab215715)、p-SMAD2(货号:ab280888)、SMAD2(货号:ab40855)及山羊抗兔(货号:ab205718)或山羊抗鼠(货号:ab205719)二抗购自英国 Abcam 公司;倒置生物显微镜(型号:IX73)购自日本奥林巴斯公司;流式细胞仪(型号:MACSQuant Tyto)购自德国 Miltenyi Biotec 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 NP69、5-8F、6-10B、CNE-1 细胞使用杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM)完全培养基培养至细胞融合 80% ~ 90%,根据实验要求进行传代、种板、冻存。使用对数生长期的细胞进行实验。  
1.2.2 qRT-PCR 测定细胞 AGR2 的表达 按照总 RNA 提取试剂盒说明书,提取 NP69、5-8F、6-10B、CNE-1 细胞 RNA,并测定 RNA 的纯度及浓度。再逆转录为 cDNA,进行 PCR 扩增。最后,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法评估 AGR2 的表达水平。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

| 基因    | 上游引物(5'-3')           | 下游引物(5'-3')             |
|-------|-----------------------|-------------------------|
| AGR2  | GTCAGCATTCTTGCTC-CTTG | GGGTCGAGAGTC-CTTTGTGTC  |
| GAPDH | ACATCGCTCAGACAC-CATG  | TGTAGTTGAGGT-CAATGAAGGG |

1.2.3 细胞转染及分组 将 5-8F 细胞随机分为对照组(Control 组)、转染阴性对照组(sh-NC 组)、敲低 AGR2 组(sh-AGR2 组)、敲低 AGR2 + TGF- $\beta$  信号通路激活剂 SRI-011381 组(sh-AGR2 + SRI-011381 组)。

其中 Control 组常规培养,sh-NC 组转染 sh-NC,sh-AGR2 组转染 sh-AGR2,sh-AGR2 + SRI-011381 组转染 sh-AGR2 后使用 10 μmol/L SRI-011381 激活 TGF-β 信号通路<sup>[11]</sup>。并采用 1.2.2 中 qRT-PCR 实验检测各组细胞中 AGR2 mRNA 的表达水平。

1.2.4 CCK8 和克隆形成实验测定各组细胞的增殖 ①CCK8:将 5-8F 细胞接种在 96 孔板中,在 37 ℃和 5%的 CO<sub>2</sub> 浓度的培养箱中培养。使用 CCK8 试剂盒测定。每孔加入 CCK8 溶液(10 μL),避光孵育 2 h,在多功能酶标仪的 450 nm 处测量每孔的吸光值(OD450)。②克隆形成实验:将 5-8F 细胞接种在 6 孔板中,培养箱培养,肉眼可见克隆后,固定液固定,结晶紫染色,拍照,统计细胞克隆数。

1.2.5 划痕实验测定各组细胞的迁移 将 5-8F 细胞接种在 6 孔板中,细胞完全融合约 90%,无菌移液枪头划伤细胞,继续培养 24 h,对 0 和 24 h 创面拍照,计算细胞划痕愈合率。

1.2.6 Transwell 实验测定各组细胞的侵袭 冰上等比例混合基质胶与无血清的 DMEM 培养基,均匀加入 Transwell 上室,培养箱晾干,加入 5-8F 细胞悬液,且下室加入含血清的 DMEM 完全培养基,放置培养箱培养 24 h,使用预冷的固定液固定,并用结晶紫染色,计算细胞侵袭数。

1.2.7 流式细胞仪测定各组细胞的凋亡 将 5-8F 细胞接种在 6 孔板培养。使用细胞凋亡测定试剂盒测定,并在流式细胞仪中分析、测定细胞凋亡率。

1.2.8 Western blot 测定各组细胞中蛋白的表达 在细胞中加入预冷的裂解液,提取细胞总蛋白,并进行蛋白定量测定。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳、分离等量蛋白,再转至 PVDF 膜,用封闭液室温封闭 2 h,在 4 ℃下与特异性抗体孵育过夜。次日,二抗孵育 1.5 h。使用 ECL 超敏发光液孵育显色,统计蛋白的表达水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析进行多组比较,并采用 SNK-q 检验进一步两两比较。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AGR2 在 NPC 细胞中的表达

与 NP69 细胞相比,5-8F、6-10B、CNE-1 细胞中 AGR2 mRNA 表达上调( $q = 14.999、1.793、5.869$ ,

$P$  均  $< 0.05$ ),且 AGR2 mRNA 在 5-8F 细胞中变化最显著,故选用 5-8F 细胞进行实验。见表 2。

表 2 AGR2 mRNA 在不同细胞中的表达 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

| 细胞       | AGR2 mRNA     |
|----------|---------------|
| NP69     | 1.02 ± 0.11   |
| 5-8F     | 1.94 ± 0.19 * |
| 6-10B    | 1.43 ± 0.15 * |
| CNE-1    | 1.38 ± 0.14 * |
| <i>F</i> | 38.102        |
| <i>P</i> | 0.001         |

注:与 NP69 细胞相比,\* $P < 0.05$ 。

2.2 AGR2 的转染效率

sh-AGR2 组与 Control 组或 sh-NC 组相比,细胞中 AGR2 mRNA 及蛋白表达减少(Control: $q = 17.426、14.923$ , $P$  均  $< 0.05$ ;sh-NC: $q = 16.440、14.380$ , $P$  均  $< 0.05$ );sh-AGR2 + SRI-011381 组与 sh-AGR2 组相比,细胞中 AGR2 mRNA 及蛋白表达水平无显著变化( $q = 0.329、0.543$ , $P$  均  $> 0.05$ )。见表 3、图 1。

表 3 各组 AGR2 的转染效率 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

| 组别                     | AGR2 mRNA      | AGR2 蛋白        |
|------------------------|----------------|----------------|
| Control 组              | 1.00 ± 0.10    | 1.11 ± 0.11    |
| sh-NC 组                | 0.97 ± 0.09    | 1.09 ± 0.12    |
| sh-AGR2 组              | 0.47 ± 0.04 ** | 0.56 ± 0.06 ** |
| sh-AGR2 + SRI-011381 组 | 0.46 ± 0.05    | 0.54 ± 0.05    |
| <i>F</i>               | 97.622         | 74.331         |
| <i>P</i>               | 0.001          | 0.001          |

注:与 Control 组相比,\* $P < 0.05$ ;与 sh-NC 组相比,# $P < 0.05$ 。

Control 组(对照组);sh-NC 组(转染阴性对照组);sh-AGR2 组(敲低 AGR2 组);sh-AGR2 + SRI-011381 组(敲低 AGR2 + TGF-β 信号通路的激活剂 SRI-011381 组)。下同。

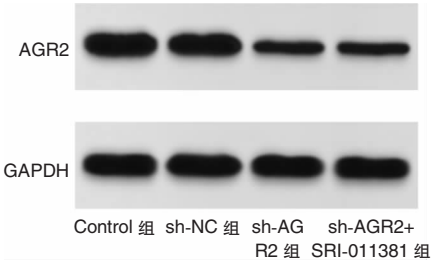


图 1 Western blot 测定 AGR2 蛋白表达

2.3 AGR2 对细胞增殖的影响

sh-AGR2 组与 Control 组或 sh-NC 组相比,细胞的 OD450、克隆数减少(Control: $q = 15.396、14.038$ , $P$  均  $< 0.05$ ;sh-NC: $q = 16.186、15.111$ , $P$  均  $< 0.05$ );sh-AGR2 + SRI-011381 组与 sh-AGR2 组相比,细胞的 OD450、克隆数增多( $q = 8.685、8.080$ ,

$P$  均  $<0.05$ )。见表 4、图 2。

2.4 AGR2 对细胞迁移的影响

与 Control 组或 sh-NC 组相比,sh-AGR2 组细胞的划痕愈合率降低 (Control: $q = 17.026, P < 0.05$ ; sh-NC: $q = 15.925, P < 0.05$ );与 sh-AGR2 组相比,sh-AGR2 + SRI-011381 组细胞的划痕愈合率升高 ( $q = 7.713, P < 0.05$ )。见表 5、图 3。

2.5 AGR2 对细胞侵袭的影响

与 Control 组或 sh-NC 组相比,sh-AGR2 组细胞的侵袭数降低 (Control: $q = 17.900, P < 0.05$ ; sh-NC:

$q = 17.079, P < 0.05$ );与 sh-AGR2 组相比,sh-AGR2 + SRI-011381 组细胞的侵袭数升高 ( $q = 9.982, P < 0.05$ )。见表 6、图 4。

2.6 AGR2 对细胞凋亡的影响

sh-AGR2 组与 Control 组或 sh-NC 组相比,细胞的凋亡率升高 (Control: $q = 40.630, P < 0.05$ ; sh-NC: $q = 40.611, P < 0.05$ );sh-AGR2 + SRI-011381 组与 sh-AGR2 组相比,细胞的凋亡率下降 ( $q = 20.723, P < 0.05$ )。见表 7、图 5。

| 表 4 各组 AGR2 对细胞增殖的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ ) |                          |                           |
|-------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 组别                                              | OD450                    | 克隆数(个)                    |
| Control 组                                       | $0.69 \pm 0.07$          | $81.25 \pm 7.98$          |
| sh-NC 组                                         | $0.71 \pm 0.08$          | $84.06 \pm 7.46$          |
| sh-AGR2 组                                       | $0.30 \pm 0.05^{* \#}$   | $44.47 \pm 4.45^{* \#}$   |
| sh-AGR2 + SRI-011381 组                          | $0.52 \pm 0.04^{\Delta}$ | $65.64 \pm 5.06^{\Delta}$ |
| $F$                                             | 56.364                   | 48.066                    |
| $P$                                             | 0.001                    | 0.001                     |

注:与 Control 组相比,  $^{*}P < 0.05$ ;与 sh-NC 组相比,  $^{\#}P < 0.05$ ;与 sh-AGR2 组相比,  $^{\Delta}P < 0.05$ 。

| 表 5 各组 AGR2 对细胞迁移的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ ) |                           |
|-------------------------------------------------|---------------------------|
| 组别                                              | 划痕愈合率(%)                  |
| Control 组                                       | $64.53 \pm 5.45$          |
| sh-NC 组                                         | $62.34 \pm 6.00$          |
| sh-AGR2 组                                       | $30.67 \pm 3.34^{* \#}$   |
| sh-AGR2 + SRI-011381 组                          | $46.01 \pm 4.25^{\Delta}$ |
| $F$                                             | 63.195                    |
| $P$                                             | 0.001                     |

注:与 Control 组相比,  $^{*}P < 0.05$ ;与 sh-NC 组相比,  $^{\#}P < 0.05$ ;与 sh-AGR2 组相比,  $^{\Delta}P < 0.05$ 。

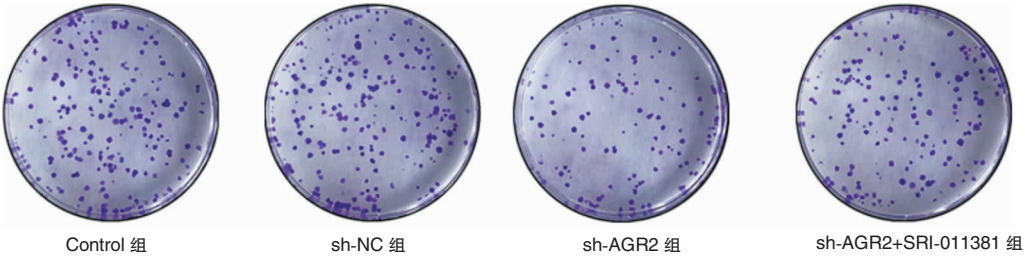


图 2 克隆形成实验测定各组细胞的增殖 (结晶紫  $\times 1$ )

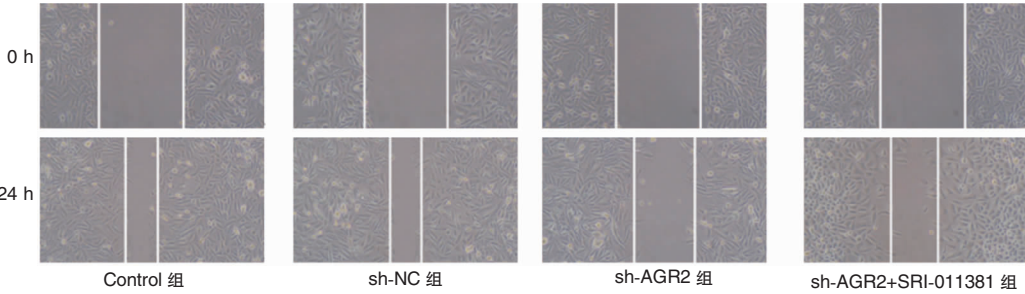


图 3 划痕实验测定各组细胞的迁移 ( $\times 100$ )

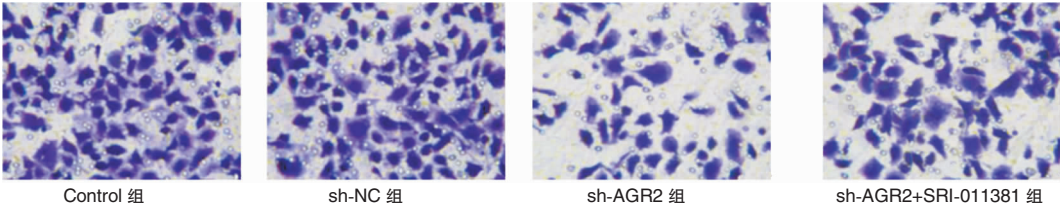


图 4 Transwell 实验测定各组细胞的侵袭 (结晶紫  $\times 400$ )

表 6 各组 AGR2 对细胞侵袭的影响 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                     | 侵袭数(个)                     |
|------------------------|----------------------------|
| Control 组              | 70.29 ± 5.05               |
| sh-NC 组                | 68.67 ± 5.57               |
| sh-AGR2 组              | 35.00 ± 3.10 <sup>*#</sup> |
| sh-AGR2 + SRI-011381 组 | 54.68 ± 5.21 <sup>△</sup>  |
| F                      | 68.789                     |
| P                      | 0.001                      |

注:与 Control 组相比, \* P < 0.05; 与 sh-NC 组相比, # P < 0.05; 与 sh-AGR2 组相比, △ P < 0.05。

表 7 各组 AGR2 对细胞凋亡的影响 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                     | 凋亡率(%)                     |
|------------------------|----------------------------|
| Control 组              | 2.50 ± 0.22                |
| sh-NC 组                | 2.52 ± 0.25                |
| sh-AGR2 组              | 44.36 ± 4.47 <sup>*#</sup> |
| sh-AGR2 + SRI-011381 组 | 23.01 ± 2.32 <sup>△</sup>  |
| F                      | 376.787                    |
| P                      | 0.001                      |

注:与 Control 组相比, \* P < 0.05; 与 sh-NC 组相比, # P < 0.05; 与 sh-AGR2 组相比, △ P < 0.05。

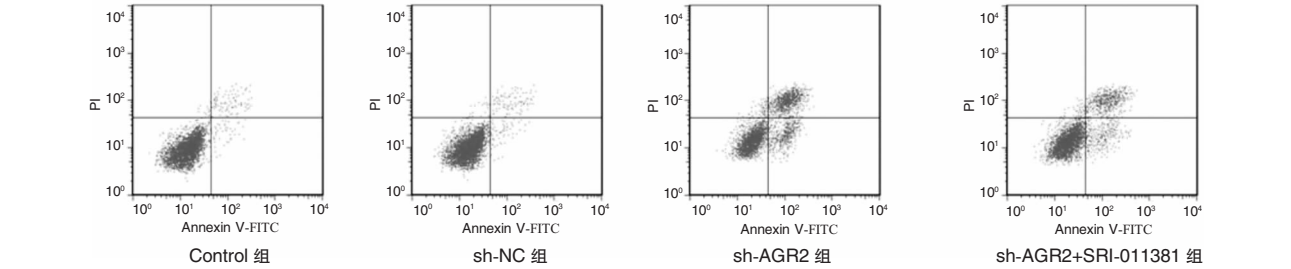


图 5 流式细胞仪测定各组细胞的凋亡

2.7 AGR2 对细胞中增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9、TGF-β1、磷酸化 SMAD 家族成员 2/SMAD 家族成员 2 (phosphorylated SMAD family member 2/SMAD family member 2, p-SMAD2/SMAD2) 蛋白表达的影响

与 Control 组或 sh-NC 组相比, sh-AGR2 组细胞中 PCNA、MMP-2、MMP-9、TGF-β1、p-SMAD2/SMAD2

表达减少 (Control: q = 14.694、14.845、14.011、13.743、15.356, P 均 < 0.05; sh-NC: q = 14.910、14.455、13.461、13.431、14.411; sh-NC: P 均 < 0.05); 与 sh-AGR2 组相比, sh-AGR2 + SRI-011381 组细胞中 PCNA、MMP-2、MMP-9、TGF-β1、p-SMAD2/SMAD2 表达增多 (q = 7.563、7.813、6.319、8.121、7.560, P 均 < 0.05)。见表 8、图 6。

表 8 各组 AGR2 对细胞中 PCNA、MMP-2、MMP-9、TGF-β1、p-SMAD2/SMAD2 蛋白表达的影响 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                     | PCNA                      | MMP-2                     | MMP-9                     | TGF-β1                    | p-SMAD2/SMAD2             |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Control 组              | 1.34 ± 0.13               | 1.51 ± 0.15               | 1.02 ± 0.12               | 0.87 ± 0.09               | 1.25 ± 0.13               |
| sh-NC 组                | 1.35 ± 0.14               | 1.49 ± 0.14               | 1.00 ± 0.10               | 0.86 ± 0.10               | 1.21 ± 0.12               |
| sh-AGR2 组              | 0.66 ± 0.07 <sup>*#</sup> | 0.75 ± 0.08 <sup>*#</sup> | 0.51 ± 0.05 <sup>*#</sup> | 0.43 ± 0.04 <sup>*#</sup> | 0.60 ± 0.06 <sup>*#</sup> |
| sh-AGR2 + SRI-011381 组 | 1.01 ± 0.10 <sup>△</sup>  | 1.15 ± 0.12 <sup>△</sup>  | 0.74 ± 0.07 <sup>△</sup>  | 0.69 ± 0.07 <sup>△</sup>  | 0.92 ± 0.09 <sup>△</sup>  |
| F                      | 50.023                    | 48.674                    | 43.994                    | 41.260                    | 50.772                    |
| P                      | 0.001                     | 0.001                     | 0.001                     | 0.001                     | 0.001                     |

注:与 Control 组相比, \* P < 0.05; 与 sh-NC 组相比, # P < 0.05; 与 sh-AGR2 组相比, △ P < 0.05。PCNA (增殖细胞核抗原); MMP (基质金属蛋白酶); TGF-β1 (转化生长因子-β1); p-SMAD2/SMAD2 (磷酸化 SMAD 家族成员 2/SMAD 家族成员 2)。下同。

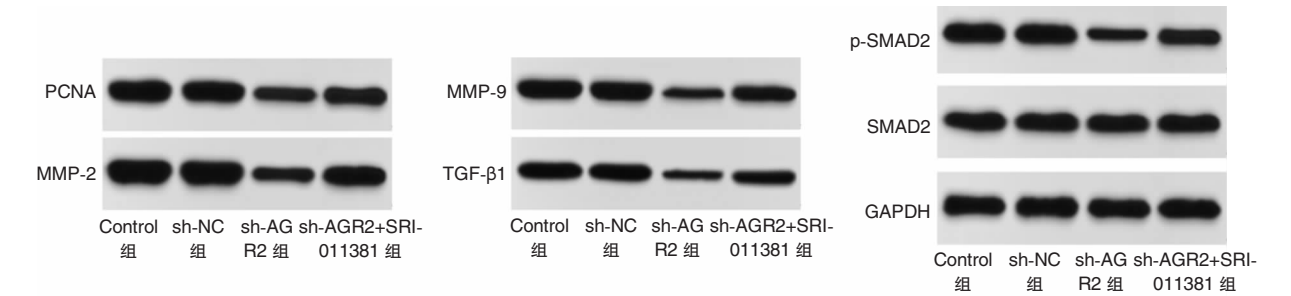


图 6 Western blot 测定各组细胞中蛋白的表达

### 3 讨论

NPC 的病因涉及 EB 病毒感染、饮食及吸烟习惯等环境因素以及遗传易感性,而遗传与环境因素的相互作用可能是其在东南亚和中国南部高发的原因<sup>[12]</sup>。此外,EB 病毒变异与遗传因素的相互作用可能增加 EB 病毒持续感染上皮细胞的风险,最终促进 NPC 的进展<sup>[13]</sup>。近年来,诊断成像技术的改进、调强放射治疗的广泛应用以及化疗方案的优化,显著改善了 NPC 患者的生存率。然而,仅早期患者可通过单纯调强放射治疗实现治愈,由于鼻咽部解剖位置隐蔽和早期症状不典型,NPC 患者在初诊时常就已处于晚期,其治疗仍然面临挑战,主要原因是复发和/或转移<sup>[14]</sup>。尽管已结合多种方案治疗,但中晚期患者的预后仍然不佳,且放射性损伤严重。因此,复发/转移性 NPC 已成为临床管理的挑战和重点,晚期 NPC 患者迫切需要新的治疗策略来改善预后。

AGR2 是蛋白质二硫键异构酶家族的成员,主要定位于内质网,与癌细胞的增殖、存活和肿瘤生长以及侵袭和转移有关<sup>[15]</sup>。作为一种分泌性分子,AGR2 可以在多种生物体液中检测到,包括血清、血浆和尿液,因此是一种很有前景的非侵入性肿瘤生物标志物<sup>[16]</sup>。He 等<sup>[17]</sup>研究表明 AGR2 在肺腺癌细胞中高表达,且过表达 AGR2 能够促进肺腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移。Zheng 等<sup>[18]</sup>也证实结直肠癌组织中 AGR2 含量显著升高,通过上调 p-AKT/AKT、磷酸化糖原合成酶激酶-3/糖原合成酶激酶-3 和  $\beta$ -连环蛋白含量,诱导细胞中 E 盒结合锌指蛋白 1、N-钙黏蛋白、波形蛋白表达增加,E-钙黏蛋白表达减少,发生上皮间质转化,促进结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。正如本研究中,AGR2 在 NPC 细胞中高表达,敲低 AGR2 可显著升高细胞凋亡率,下调 PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达,降低细胞存活率、划痕愈合率及细胞侵袭数,进而减弱细胞的增殖、迁移和侵袭能力。与 Zhang 等<sup>[19]</sup>研究相似,AGR2 在前列腺素 E2 诱导的结直肠癌中通过 EP4-PI3K-AKT 信号通路上调,而 AGR2 敲低增强了环氧化酶-2 抑制剂塞来昔布对结直肠癌转移的治疗作用。研究揭示,敲低 AGR2 可通过促进细胞凋亡,抑制细胞的增殖、迁移、侵袭,成为 NPC 的潜在治疗靶点。然而,在 NPC 中 AGR2 通过哪种通路发挥促癌作用需要进一步深入探索。

TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路是一种高度保守的分子机制,通过调节细胞增殖、凋亡、分化、运动、谱系特异性和干细胞稳态影响癌症发生发展<sup>[8]</sup>。TGF- $\beta$  的异常表达常发生于病理状态,尤其是在癌症晚期,TGF- $\beta$  的活化可促进肿瘤的发生,包括转移和化疗耐药<sup>[20]</sup>。在经典的 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路中,TGF- $\beta$  家族的细胞因子首先与 T $\beta$ R I 和 T $\beta$ R II 受体结合。具有激酶活性的 T $\beta$ R I 进一步磷酸化 SMAD2 和 SMAD3 蛋白,活化的 SMAD2 和 SMAD3 可以与 SMAD4 结合,最终完成 SMAD 多聚体的形成,进而转位到细胞核内调节基因转录<sup>[21]</sup>。研究证明,激活 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路可促进膀胱癌进展<sup>[22]</sup>。而抑制 TGF- $\beta$ /SMAD 通路有助于降低结直肠癌细胞活力,抑制其转移和肿瘤生长<sup>[23]</sup>。在本研究中,敲低 AGR2 使 TGF- $\beta$ 1 和 p-SMAD2/SMAD2 表达降低,抑制 5-8F 细胞的增殖、迁移、侵袭,促进细胞凋亡;但 TGF- $\beta$  信号通路激活剂 SRI-011381 可部分逆转敲低 AGR2 对 5-8F 细胞的抑制作用,降低细胞凋亡率。与 Feng 等<sup>[11]</sup>报道相似,提示敲低 AGR2 可通过抑制 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路,抑制 NPC 细胞增殖、迁移、侵袭,促进细胞凋亡发生。

综上所述,AGR2 在 NPC 细胞中高表达,其可能通过调控 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路,进而增强 NPC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,抑制细胞凋亡的发生。本研究通过体外实验得到了验证,为 NPC 的研究提供新的理论依据,但 AGR2 作为一种分泌蛋白通过直接或间接途径调节癌症的生物学特性及对机体的影响目前尚不明确,仍需进一步进行体内相关实验。

### 参考文献:

- [1] London AO, Gallagher LW, Sharma RK, et al. Impact of race, ethnicity, and socioeconomic status on nasopharyngeal carcinoma disease-specific and conditional survival [J]. J Neurol Surg B Skull Base, 2021, 83(5):451-460.
- [2] Jicman Stan D, Niculet E, Lungu M, et al. Nasopharyngeal carcinoma: A new synthesis of literature data (Review) [J]. Exp Ther Med, 2022, 23(2):136.
- [3] 谢民强. 鼻咽癌治疗研究进展 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2023, 29(6):1-10.
- [4] Yao JJ, Qi ZY, Liu ZG, et al. Clinical features and survival outcomes between ascending and descending types of nasopharyngeal carcinoma in the intensity-modulated radiotherapy era: A big-data intelligence platform-based analysis [J]. Radiother Oncol, 2019, 137:137-144.
- [5] Zhang K, Li Y, Kong X, et al. AGR2: A secreted protein worthy

of attention in diagnosis and treatment of breast cancer[J]. *Front Oncol*, 2023, 13:119 – 125.

[6] 韩明明, 王丽丽, 张鹏举, 等. 晚期鼻咽癌调强放疗同步 TP 方案前后的血清前梯度蛋白表达水平及其疗效预测价值[J]. *河北医科大学学报*, 2024, 45(7):756 – 760.

[7] Tian S, Chu Y, Hu J, et al. Tumour-associated neutrophils secrete AGR2 to promote colorectal cancer metastasis via its receptor CD98hc-xCT[J]. *Gut*, 2022, 71(12):2489 – 2501.

[8] Xin X, Cheng X, Zeng F, et al. The role of TGF-β/SMAD signaling in hepatocellular carcinoma: From mechanism to therapy and prognosis[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(4):1436 – 1451.

[9] Aashaq S, Batool A, Mir SA, et al. TGF-β signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(1):59 – 85.

[10] He F, Feng G, Ma N, et al. GDF10 inhibits cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma by the transforming growth factor-β/Smad and NF-κB pathways[J]. *Carcinogenesis*, 2022, 43(2):94 – 103.

[11] Feng J, Li Y, He F, et al. RBM15 silencing promotes ferroptosis by regulating the TGF-β/Smad2 pathway in lung cancer[J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(4):950 – 961.

[12] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5):584 – 590.

[13] Tsang CM, Lui VWY, Bruce JP, et al. Translational genomics of nasopharyngeal cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 61:84 – 100.

[14] Huang H, Yao Y, Deng X, et al. Immunotherapy for nasopharyngeal carcinoma: Current status and prospects (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2023, 63(2):97.

[15] Moidu NA, A Rahman NS, Syafruddin SE, et al. Secretion of pro-oncogenic AGR2 protein in cancer[J]. *Heliyon*, 2020, 6(9):e05000.

[16] Jach D, Cheng Y, Prica F, et al. From development to cancer – an ever-increasing role of AGR2[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(11):5249 – 5262.

[17] He J, Fu Y, Hu J, et al. Hypomethylation-mediated AGR2 over-expression facilitates cell proliferation, migration, and invasion of lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13:5177 – 5185.

[18] Zheng C, Mao Y, Ye J, et al. Function and mechanism of exogenous AGR2 in colorectal cancer cells[J]. *Heliyon*, 2024, 10(7):e28175.

[19] Zhang H, Chi J, Hu J, et al. Intracellular AGR2 transduces PGE2 stimuli to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 518:180 – 195.

[20] Shi X, Yang J, Deng S, et al. TGF-β signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1):135.

[21] Tu S, Huang W, Huang C, et al. Contextual regulation of TGF-β signaling in liver cancer[J]. *Cells*, 2019, 8(10):1235.

[22] Shi H, Xie J, Wang K, et al. LINC01451 drives epithelial-mesenchymal transition and progression in bladder cancer cells via LIN28/TGF-β/Smad pathway[J]. *Cell Signal*, 2021, 81:109 – 122.

[23] Xia YZ, Shan GF, Yang H, et al. Cisatracurium regulates the CXCR4/let-7a-5p axis to inhibit colorectal cancer progression by suppressing TGF-β/SMAD2/3 signalling[J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 339:109424.

(收稿日期:2024 – 11 – 27;网络首发:2025 – 09 – 10)

**本文引用格式:**金辉,黄文霞,王珍,等. AGR2 通过调控 TGF-β/SMAD 信号通路对鼻咽癌细胞迁移和侵袭的影响[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2025, 31(6):53 – 59. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007 – 1520. 202524496

**Cite this article as:**JIN Hui, HUANG Wenxia, WANG Zhen, et al. The effect of AGR2 on the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by regulating the TGF-β/SMAD signaling pathway[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2025, 31(6):53 – 59. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007 – 1520. 202524496