

母抗十二肽同源物 7 在头颈鳞状细胞癌的表达及其预后诊断价值

赵海惠^{1,2} 钟晓娟^{2,3} 黄怡² 费伟^{1,2,4}

1. 西南医科大学口腔医学院, 泸州 646000;

2. 四川省医学科学院·四川省人民医院口腔医学中心, 成都 610072;

3. 电子科技大学医学院, 成都 610051; 4. 四川省人民医院温江医院口腔科, 成都 610203

[摘要] **目的** 通过生物信息学分析及基础实验探究母抗十二肽同源物 (SMAD) 7 对头颈鳞状细胞癌 (HNSCC) 的生物学功能及临床价值。**方法** 在公开数据库中研究 SMAD7 在 HNSCC 中的表达, Western blot 检测 HNSCC 细胞系与正常上皮细胞中 SMAD7 的表达; 沉默 SMAD7 高表达的 HNSCC 细胞系 HSC-4, 分别进行 CCK-8、Transwell 实验、细胞划痕等实验研究 SMAD7 对 HSC-4 细胞生物学功能的影响; 在 UCSC xena 中获得 HNSCC 表达谱数据, 筛选 SMAD7 的相关基因, 进行基因本体论、京都基因与基因组百科全书基因富集分析, 构建共表达基因相互作用网络, 筛选相关细胞信号通路, Western blot 检测沉默 SMAD7 的 HNSCC 细胞中的相关细胞信号通路蛋白的表达变化; 利用 cBioPortal 分析 SMAD7 基因突变率、运用 MethSurv 数据库分析 SMAD7 基因甲基化水平及其与预后水平的关系, 受试者工作特征曲线评估 SMAD7 对 HNSCC 的诊断价值; TIMER2.0 分析 SMAD7 表达与免疫细胞浸润相关性。**结果** SMAD7 在 HNSCC 肿瘤组织及部分细胞系中高度表达。沉默 SMAD7 表达可显著抑制癌症细胞的增殖、迁移和侵袭。沉默 SMAD7 可诱导血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 的下调。通过生物信息学分析, SMAD7 的基因突变率和基因甲基化水平与 HNSCC 患者的预后显著相关。此外, SMAD7 的表达与 HNSCC 中的免疫细胞浸润水平有关。**结论** SMAD7 通过调节 VCAM-1 表达促进 HNSCC 细胞增殖、迁移和侵袭, 可能是 HNSCC 潜在的肿瘤生物标志物和治疗靶点。

[关键词] 母抗十二肽同源物 7; 头颈鳞状细胞癌; 血管细胞黏附分子 1; 诊断; 免疫治疗

[中图分类号] R739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2024341



本文链接 开放科学标识码

Expression and prognostic value of mothers against decapentaplegic homolog 7 in head and neck squamous cell carcinoma

Zhao Haihui^{1,2}, Zhong Xiaojuan^{2,3}, Huang Yi², Fei Wei^{1,2,4}

1. School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Oral Medicine Center, Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; 3. School of Medicine, University of Electronic Science and Technology, Chengdu 610051, China; 4. Dept. of Stomatology, Wenjiang Hospital of Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610203, China

Supported by: The Scientific Research Foundation of Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital (2021LZ01)

Correspondence: Fei Wei, E-mail: fwross10@sina.com

[收稿日期] 2024-09-12; **[修回日期]** 2025-04-08

[基金项目] 四川省医学科学院·四川省人民医院院科研基金 (20-21LZ01)

[第一作者] 赵海惠, 硕士, E-mail: 1359218756@qq.com

[通信作者] 费伟, 教授, 博士, E-mail: fwross10@sina.com

[Abstract] **Objective** This study aimed to explore the biological functions and clinical value of mothers against decapentaplegic homolog (SMAD) 7 in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) through bioinformatics analysis and basic experiments. **Methods** The

expression of SMAD7 in HNSCC in public databases was studied. Western blot was used to detect the expression of SMAD7 in HNSCC cell lines and normal epithelial cells. The SMAD7 highly expressed HNSCC cell line HSC-4 was silenced, and CCK-8, Transwell assays, and cell scratch experiments were conducted to study the effect of SMAD7 on the biological functions of HSC-4 cells. HNSCC expression profile data were obtained from UCSC xena, and genes related to SMAD7 were selected for gene ontology and Kyoto encyclopedia of genes and genomes gene enrichment analysis, construction of a co-expression gene interaction network, and screening of related cell signaling pathways. Western blot was used to detect the expression changes of proteins in the related cell signaling pathways in HNSCC cells with silenced SMAD7. cBioPortal was utilized to analyze the mutation rate of the SMAD7 gene, and the MethSurv database was used to analyze the methylation level of the SMAD7 gene and its correlation with prognosis. The receiver operating characteristic curve was used to assess the diagnostic value of SMAD7 for HNSCC. TIMER2.0 was used to analyze the correlation between SMAD7 expression and immune cell infiltration. **Results** SMAD7 was highly expressed in HNSCC tumor tissues and some cell lines. Silencing the expression of SMAD7 can significantly inhibit the proliferation, migration, and invasion of cancer cells. Silencing SMAD7 can induce the downregulation of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). The bioinformatics analysis showed that the mutation rate of the SMAD7 gene and the methylation level were significantly correlated with the prognosis of patients with HNSCC. The expression of SMAD7 was related to the level of immune cell infiltration in HNSCC. **Conclusion** SMAD7 promotes the proliferation, migration, and invasion of HNSCC cells by regulating the expression of VCAM-1. It may be a potential tumor biomarker and therapeutic target for HNSCC.

[Key words] mothers against decapentaplegic homolog 7; head and neck squamous cell carcinoma; vascular cell adhesion molecule 1; diagnosis; immunotherapy

头颈鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 是全球范围内较常见的癌症之一, 通常与吸烟、饮酒和某些类型的人类乳头瘤病毒感染等风险因素有关^[1-2]。2022年估计发病率为2%, 死亡率为1.9%^[3]。由于HNSCC常伴随高转移率和高复发率, 通过手术、放疗、化疗、靶向治疗和免疫治疗等这些多学科治疗可以减少死亡率^[4]。早期诊断和治疗的患者表现出更好的预后, 但HNSCC通常在晚期才被诊断, 加之其复杂的病理机制, HNSCC的治疗仍然面临重大挑战^[5]。因此, 迫切需要确定HNSCC精准的早期诊断生物标志物、预后生物标志物和治疗靶点。

母抗十二肽同源物 (mothers against decapentaplegic homolog, SMAD) 是一组蛋白质, 在转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β) 超家族的信号传导中发挥核心作用^[6]。SMAD7作为一种抑制性SMAD蛋白^[7], 与血管重塑相关联^[8], 主要通过调节TGF- β 信号通路发挥作用。血管重塑是指血管结构和功能随时间发生的变化, 这在多种生理和病理过程中都非常重要, 如在发育、伤口愈合、肿瘤血管生成、动脉粥样硬化和一些心血管疾病中^[6-7,9-14]。且有研究^[15]表明SMAD7可能是肿瘤治疗中的一个潜在靶点。最近, 它在多种癌症中的作用被报道, 包括乳腺癌^[16]、肝细

胞癌^[17]、结直肠癌^[18]、胶质母细胞瘤^[19]、非小细胞肺癌^[20]、胃癌^[21]。SMAD7在多种癌症中被认为具有抑制肿瘤的作用。它通过负向调节TGF- β 信号通路, 影响细胞增殖、分化和凋亡^[15]。

血管细胞黏附分子1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) 是一种细胞表面糖蛋白, 属于免疫球蛋白超家族成员^[22]。研究^[23]发现头颈癌患者治疗前血清中VCAM-1显著高于健康志愿者, 可能作为头颈癌筛查的一个因素, 且HNSCC衍生的间充质干细胞 (mesenchymal stromal cells, MSC) 可以表达VCAM-1, 它在T细胞与MSC的物理相互作用中起着关键作用, 并可能通过这种方式影响T细胞的行为^[24]。加之VCAM-1在血管重塑中也起着多方面的作用, 包括促进白细胞黏附和迁移、参与炎症反应和血管修复过程^[25]。M2型巨噬细胞通过直接与内皮细胞共培养来下调极晚期抗原4 (very late antigen-4, VLA4) 和VCAM-1的表达, 从而减少血管通透性。靶向VLA4/VCAM-1轴可以增强血管完整性并抑制卵巢癌体内腹水的形成^[26]。VCAM-1在多种癌症中过表达, 包括急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML)^[27]、结直肠癌^[28]、乙型肝炎病毒相关肝细胞癌^[29]等。VCAM-1和SMAD7虽然在细胞信号传导中扮演不同的角色, 但它们在某些生物学过程和疾病中

可能存在交互作用。然而，SMAD7和VCAM-1在HNSCC发展和进展中的相关性仍然难以确定。

在本研究中，通过生物信息学结合细胞实验研究SMAD7在HNSCC中的表达情况及其对患者预后的影响，探究SMAD7调节VCAM-1影响HNSCC生物学行为的机制，评估SMAD7与HNSCC基因突变、DNA甲基化和免疫细胞浸润的相关性。

1 材料和方法

1.1 数据获取

从UCSC xena (<https://xenabrowser.net/>) 获得HNSCC的RNA-seq数据和临床信息，包括528个肿瘤样本、2个转移样本和82个相邻正常组织的转录组数据和相应患者的临床信息(表1)。

表 1 HNSCC的临床病理特征

Tab 1 Clinical and pathological characteristics of HNSCC patients n=612

临床病理特征		例数
年龄/岁	≥60	344
	<60	267
	未报道	1
性别	男	444
	女	168
饮酒史	无	197
	有	401
	未报道	14
抽烟史	无	255
	有	357
病理T分期	0	1
	1	52
	2	167
	3	122
	4	208
	未报道	62
	临床分期	I
	II	120
	III	137
	IV	318
	未报道	14
病理上淋巴结转移	无	206
	有	290
	未报道	116

1.2 SMAD7在多种肿瘤中的表达及与HNSCC临床病理特征的相关性

从TIMER2.0 (<http://timer.cistrome.org/>) 数据库获得SMAD7在所有癌症基因组图谱(the can-

cer genome atlas, TCGA) 肿瘤中的表达及HNSCC中SMAD7的表达与HNSCC临床病理特征的相关性。从GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) 数据库获得SMAD7在TCGA肿瘤中的表达，尤其是HNSCC。

1.3 试剂和仪器

人HNSCC细胞系HSC-4、CAL-27、SCC-9，人口腔黏膜癌前病变细胞DOK，正常口腔上皮角质细胞HOK由四川大学口腔疾病防治全国重点实验室惠赠。DMEM高糖培养基、胰蛋白酶(Gibco公司，美国)，胎牛血清(浙江美森细胞科技有限公司)，青-链霉素混合液(Hyclone公司，美国)，助转染剂(SignaGen Laboratories公司，美国)，嘌呤霉素(Biofoxx公司，德国)，兔抗人SMAD7单克隆抗体(湖南远泰生物技术有限公司)，β-actin抗体(SAB公司，美国)，兔二抗IgG-HRP、酶标仪(Thermo公司，美国)，全蛋白提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)，聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、Cell Counting Kit-8试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司)。3种靶向沉默SMAD7基因的shRNA和1种无意义的NegativeshRNA慢病毒载体(即sh1、sh2、sh3、control)由美国GeneCopoeia公司合成，序列见表2。

表 2 4种双链shRNA序列

Tab 2 Four double-stranded shRNA sequences

慢病毒载体	靶点序列
control	5'-GCTTCGCGCCGTAGTCTTA-3'
sh1	5'-GGATATCTTCTATGATCTACC-3'
sh2	5'-GCCGAACCAGAACCAATTATT-3'
sh3	5'-GCTCAATGAGCATGTTTAGAC-3'

1.4 细胞培养

SCC-9在添加了10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1%青-链霉素及5 μg/mL氢化可的松混合液的F12培养基中培养，HSC-4、CAL-27、DOK细胞在添加了10%FBS和1%青-链霉素混合液的DMEM培养基中培养，HOK细胞在含生长因子的K-SFM培养基中培养。所有细胞在37℃、5%CO₂的孵育箱进行培养、传代。用SMAD7特异性shRNA转染HSC-4细胞(sh1、sh2、sh3)。同时，使用非靶向shRNA转染HSC-4细胞作为阴性对照(control组)，进行细胞实验。

1.5 细胞增殖实验

将4组细胞以每孔2000个的密度接种在96孔板中，在1、2、3、4和5d于上述孔板中加入10%CCK-8溶液孵育2h，在450nm处检测光密度

(optical density, OD)值。

1.6 细胞迁移和侵袭能力检测

细胞划痕实验检测细胞迁移情况。将4组细胞分别接种到6孔板中,细胞融合度达到80%~90%后,用1 mL移液管尖端刮擦细胞层,划痕完成后,洗去漂浮细胞,继续培养,在0、24、48 h观察并拍照。Transwell实验检测细胞侵袭能力。用不含FBS的培养基分别重悬4组细胞,将 1×10^5 个细胞接种到12孔Transwell小室中,每个小室上层加入200 μ L。将含有20%FBS的600 μ L培养基放入下室。24 h后,将穿过的细胞用4%多聚甲醛固定,并用0.1%结晶紫染色。通过显微镜(100倍放大)计数迁移的细胞个数。

1.7 Western blot检测细胞SMAD7及相关蛋白表达

采用全蛋白提取试剂盒对4组细胞进行总蛋白提取、蛋白定量检测、电泳、转膜、5%脱脂牛奶封闭、一抗(SMAD7、VCAM-1一抗稀释比例均为1:1 000)孵育过夜、二抗孵育、电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂盒处理PVDF膜,打开Bio-Rad凝胶图像处理系统,进行曝光显影,采集图片,并使用ImageJ软件进行图像分析。

1.8 基因集富集分析

在HNSCC的表达谱中,根据SMAD7基因表达中位数分为高SMAD7组和低SMAD7组,运用R软件DESeq2(1.26.0)包,以 $|\log_2(FC)| > 1.5$ 和 $Adj.p\ value < 0.05$ 为条件,筛选SMAD7共表达差异基因。用R软件ggplot2包绘制火山图和热图。STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>)对数据集中SMAD7共表达基因进行蛋白质互作网络(protein interaction network, PPI)构建,并且利用Cytoscape(3.9.1)的ClueGO插件对SMAD7及top20共表达差异基因进行基因本体论(gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,GO分析分为分子功能(molecular function, MF)、生物学过程(biological process, BP)和细胞成分(cellular component, CC)3类。

1.9 HNSCC中SMAD7与VCAM-1表达的相关性

基于富集分析结果,使用GEPIA及TIMER2.0研究HNSCC中SMAD7与VCAM-1表达的相关性,推测其相互作用机制,并在细胞实验中通过Western blot验证SMAD7敲低后VCAM-1的表达变化。

1.10 SMAD7在HNSCC的诊断和预后价值分析

使用GEPIA及GraphPad 9.0探索TCGA和GEO数据集中SMAD7在HNSCC的诊断和预后价

值分析。

1.11 基因突变和DNA甲基化分析

选择cBioPortal(<https://www.cbioportal.org/>)数据库分析SMAD7的遗传变异及其与HNSCC患者总生存率(over survival, OS)和无进展生存期(progression-free survival, PFS)的相关性。

选择MethSurv(<https://biit.cs.ut.ee/methsurv/>)评估SMAD7的DNA甲基化水平,以及SMAD7 DNA甲基化对HNSCC患者的预后价值。

1.12 免疫浸润分析

选择TISCH(<http://tisch.comp-genomics.org/>)分析SMAD7在不同数据集和细胞类型中的表达。

在ScTIME Portal(<http://sctime.sklehac.com/>)平台HNSC-GSE103322中进行免疫细胞聚类分析,研究HNSCC中22种免疫细胞及肿瘤细胞的相关性。

选择TIMER2.0(<http://timer.cistrome.org/>)研究HNSCC中SMAD7表达与B细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞及树突状细胞之间的关系。为了进一步证实HNSCC中SMAD7表达与免疫细胞浸润水平之间的关系,在TIMER2.0中使用Spearman相关性分析来探索SMAD7与免疫细胞免疫标志物之间的相关性,并将纯度调整后的部分Spearman rho值作为其相关性程度。

1.13 统计分析

所有数据均使用R软件(版本4.4.1)、GraphPad 9.0进行处理。使用One-Way ANOVA检验比较不同组中SMAD7的表达。采用卡方检验分析SMAD7表达与临床病理因素的相关性。受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)法分析SMAD7对HNSCC的临床诊断价值。采用Kaplan-Meier(KM)方法和单因素、多因素COX回归分析SMAD7的临床意义与预后(OS)的相关性。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

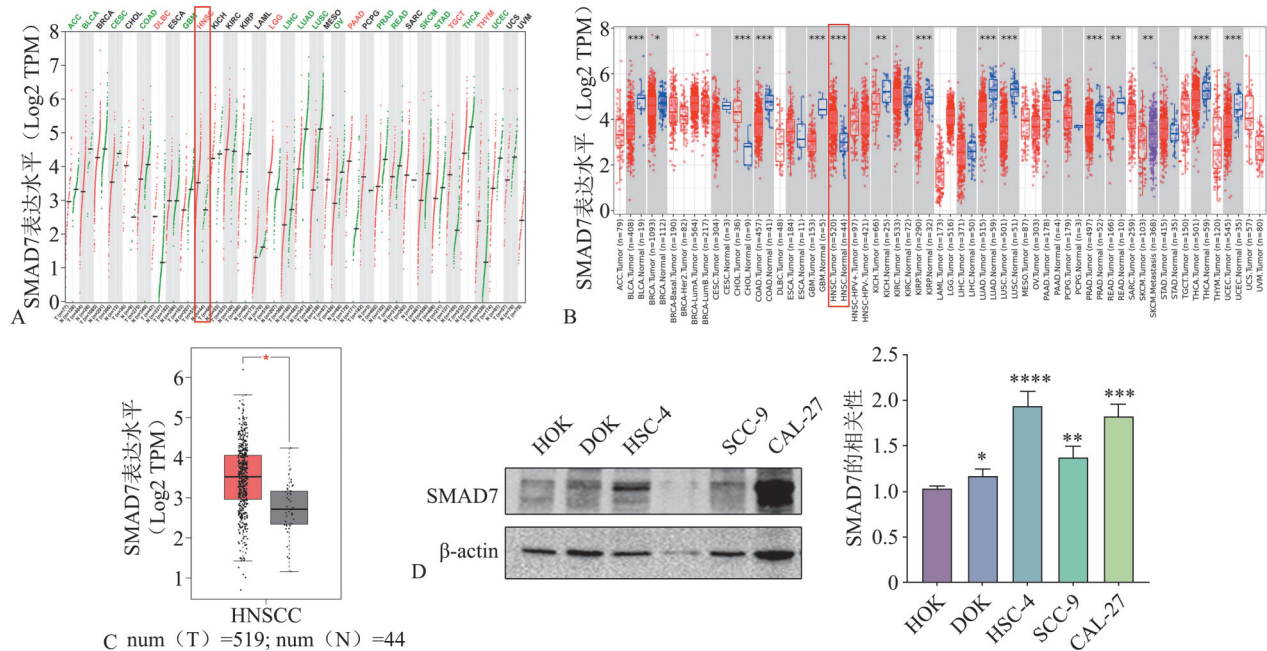
2 结果

2.1 SMAD7在HNSCC中的表达及与临床病理特征的相关性

TIMER2.0和GEPIA的数据显示,SMAD7在HNSCC肿瘤组织中的表达显著高于癌旁组织和正常组织,这表明SMAD7可能是一种新的癌基因(图1A~C)。使用Western blot进一步研究HNSCC细胞系中SMAD7的表达,证实了SMAD7在肿瘤细胞中的表达高于正常细胞,其中HSC-4细胞中

SMAD7 表达最明显 (图 1D)。在 TIMER2.0 数据库中, SMAD7 在 HNSCC 组织中的表达与年龄、

性别、分期等临床病理特征相关。



A、B: GEPIA 和 TIMER2.0 数据库泛癌肿瘤组织和癌旁组织样本中 SMAD7 mRNA 差异表达; C: GEPIA 数据库 HNSCC 样本中 SMAD7 的差异表达; D: Western blot 分析 HSC-4、CAL-27、SCC-9、DOK、HOK 中 SMAD7 的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 SMAD7 在 HNSCC 中高表达

Fig 1 SMAD7 is highly expressed in HNSCC

2.2 SMAD7 对 HNSCC 细胞恶性生物学行为的影响

为了研究 SMAD7 对 HNSCC 细胞功能的影响, 使用 shRNA 抑制 HSC-4 细胞中 SMAD7 的表达 (图 2A、B)。CCK-8 测定结果表明, 与 control 组相比较, sh1、sh2、sh3 组 HSC-4 细胞的增殖显著降低 (图 2C)。Transwell 实验和细胞划痕愈合实验显示, 下调 SMAD7 的表达可显著抑制 HSC-4 细胞迁移和侵袭 (图 2D、E)。结果表明, SMAD7 表达可促进 HNSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭。

2.3 HNSCC 中 SMAD7 对 VCAM-1 表达的影响

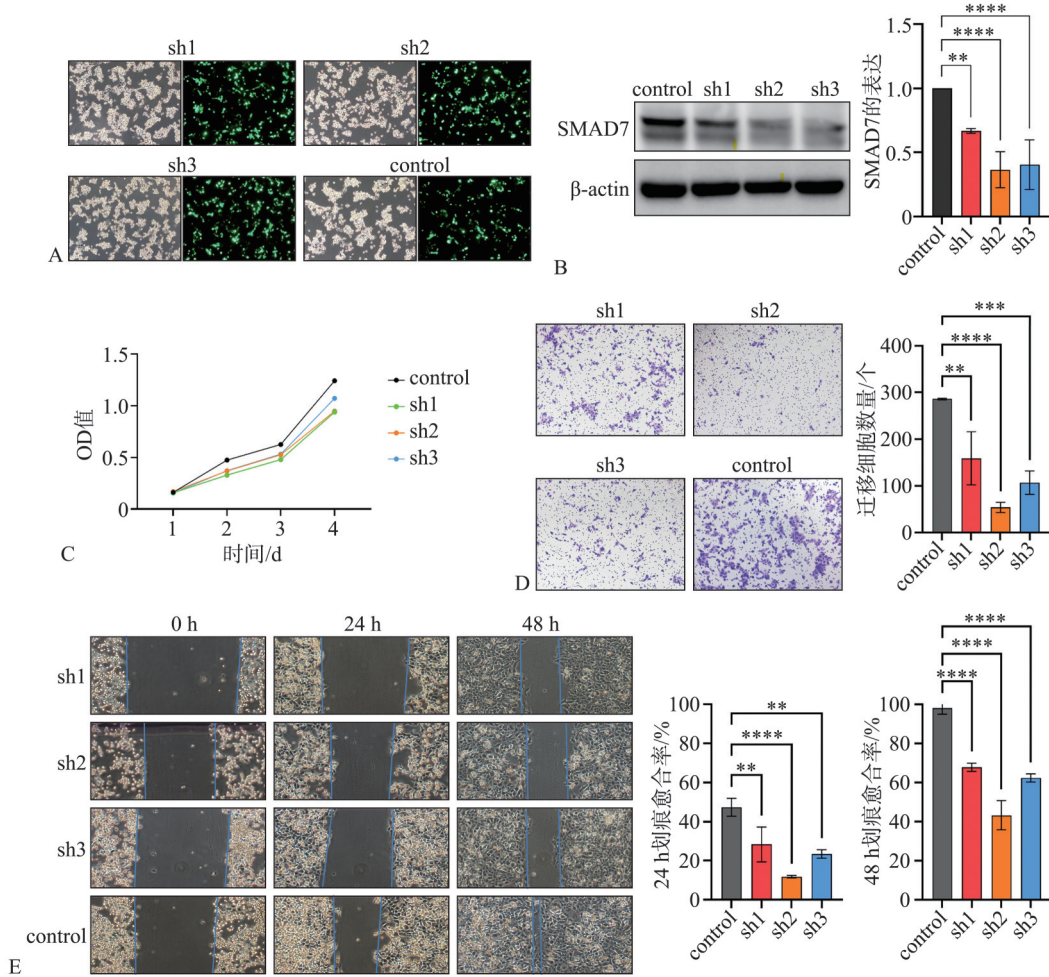
为研究 SMAD7 与共表达基因相关性, 筛选了 SMAD7 共表达基因。结果发现 HNSCC 患者中 SMAD7 共表达基因有 188 个上调和 75 个下调 (图 3A), STRING 和 Cytoscape 制作共表达基因 PPI 初步了解各基因之间的相互作用 ($P < 0.05$) (图 3B、C), 筛选出 top20 的基因, 进一步探究 SMAD7 与 top20 基因之间的相互作用 (图 3D、E), 并对其进行 GO 和 KEGG 富集分析, 结果显示这 21 个基因主要富集于 cell matrix adhesion (细胞-基质黏附)、collagen-containing extracellular matrix (含有胶原

的细胞外基质)、collagen binding (胶原结合)、protein digestion and absorption (蛋白质的消化和吸收) 等通路, 主要与细胞的识别、细胞的活化和信号转导、细胞的增殖与分化、细胞的伸展与移动等多种相关途径有关 (图 4)。

富集分析结果表明 VCAM-1 与 SMAD7 共同富集在多个信号通路, 且 VCAM-1 与肿瘤血管生成及癌症细胞转移相关。GEPIA 与 TIMER2.0 对 TCGA 数据进行了分析, 显示 SMAD7 表达与 VCAM-1 具有相关性 ($P < 0.05$) (图 5A、B)。Western blot 结果显示, 下调 SMAD7 表达可以抑制 HSC-4 细胞中的 VCAM-1 (图 5C)。结果表明, 抑制 SMAD7 表达可以有效地下调 VCAM-1 的表达水平, 为 HNSCC 的早期治疗提供了新的靶点。

2.4 SMAD7 在 HNSCC 中的诊断和预后价值

使用 TCGA 和 GEO 数据集探索 SMAD7 在 HNSCC 中的诊断潜力。结果表明 SMAD7 对 HNSCC 的早期诊断有价值 ($AUC = 0.7629$) (图 6A), 但是 SMAD7 表达较高的患者并没有较差的 OS 和无病生存率 (disease free survival, DFS) (图 6B~D)。



A: HSC-4细胞转染质粒后的荧光图 (×40); B: Western blot检测表明转染 sh-SMAD7后 HSC-4细胞中 SMAD7表达下调; C: CCK-8测定发现 SMAD7下调抑制 HSC-4细胞的增殖; D、E: Transwell和划痕愈合实验表明 SMAD7的下调减弱了 HSC-4细胞的迁移和侵袭能力, D、E图左侧放大倍数为40。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 2 下调 SMAD7 表达可以降低 HNSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

Fig 2 Knockdown of SMAD7 suppressed proliferation, migration and invasion of HNSCC cells

2.5 SMAD7基因突变和DNA甲基化

cBioPortal数据库分析发现HNSCC中SMAD7基因发生增加、深度缺失的频率分别为1.08%和0.41%, SMAD7突变率为1.5% (22/1 476)。KM图和数秩检验的结果表明, SMAD7遗传变异较高的患者并没有较差的OS和PFS ($P > 0.05$)。

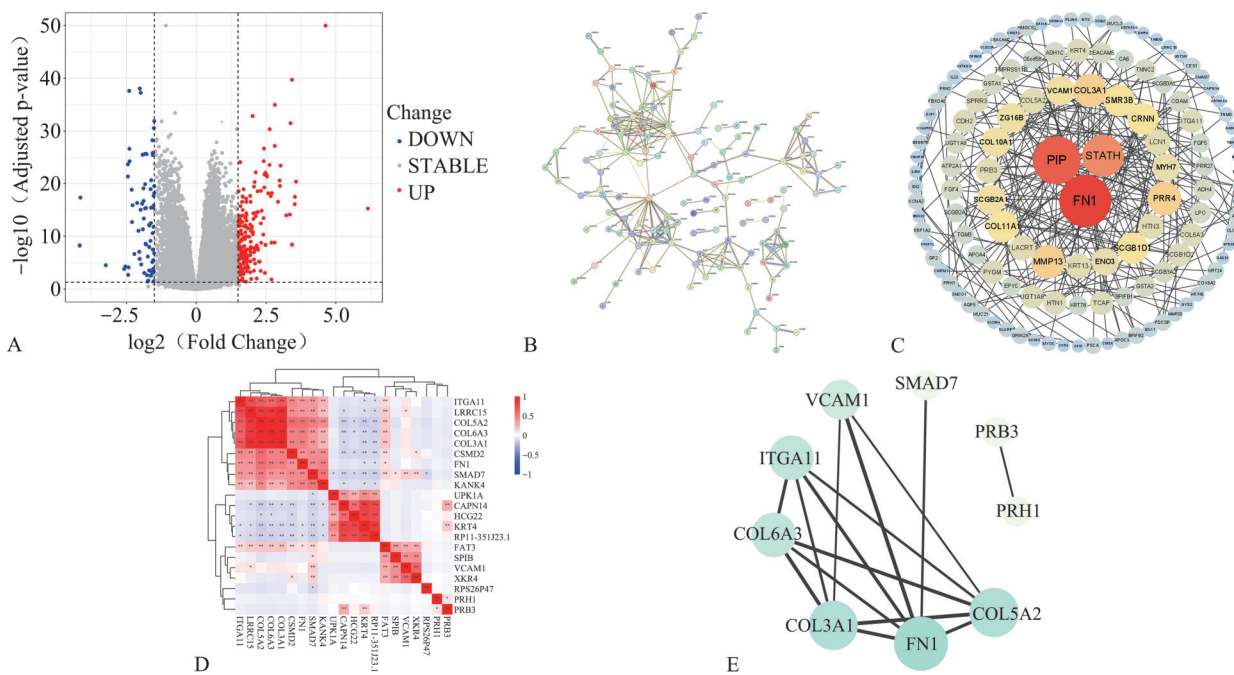
在MethSurv中探索了SMAD7 DNA甲基化的热图, 结果显示, HNSCC样本中有18个SMAD7的DNA甲基化水平发生改变(图7A)。COX回归和KM分析发现Cg00214056、Cg07661480、Cg-14283454、Cg05119084、Cg13398027位点DNA甲基化与HNSCC预后密切相关 ($P < 0.05$, 图7B、C)。DNA甲基化可能是SMAD7过表达的一个促成因素。这些结果表明, SMAD7的甲基化可能会显著影响HNSCC患者的预后。

2.6 SMAD7表达与肿瘤免疫浸润的关系

利用TISCH数据库发现, SMAD7在CD4+T细胞、CD8+T细胞及树突状细胞等各种免疫细胞中高表达, 尤其在HNSC-GSE103322中SMAD7表达最显著, 对其进行免疫细胞聚类分析, 可视化各免疫细胞中SMAD7的表达, 分析HNSCC中22种免疫细胞及肿瘤细胞的相关性, 结果提示肿瘤细胞与CD4细胞、CD8细胞和B细胞等免疫细胞呈负相关。

利用TIMER2.0数据库发现, SMAD7表达与CD4+T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞的浸润水平呈正相关(图8A)。XCELL分析结果表明, SMAD7表达与M1巨噬细胞的浸润程度呈正相关(图8B), 但与M2巨噬细胞的浸润水平无显著相关性。SMAD7表达与单核细胞、肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages,

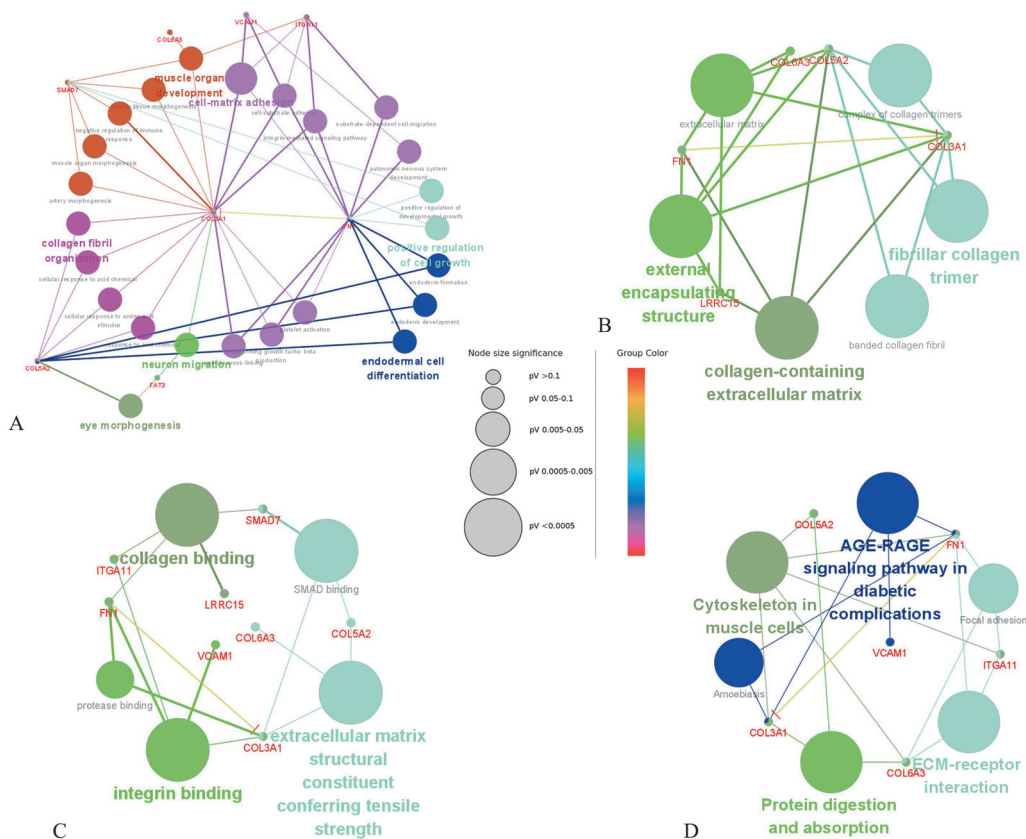
TAM)、M1及M2巨噬细胞的大多数标志物之间存在显著相关性 ($P < 0.05$) (图8C~F)。



A: SMAD7共表达差异基因火山图; B: STRING分析SMAD7的PPI; C: Cytoscape软件分析SMAD7的PPI; D: SMAD7中TOP20共表达差异基因热图; E: Cytoscape软件分析SMAD7中TOP20的蛋白互作关键基因。

图3 HNSCC中SMAD7共表达基因的PPI

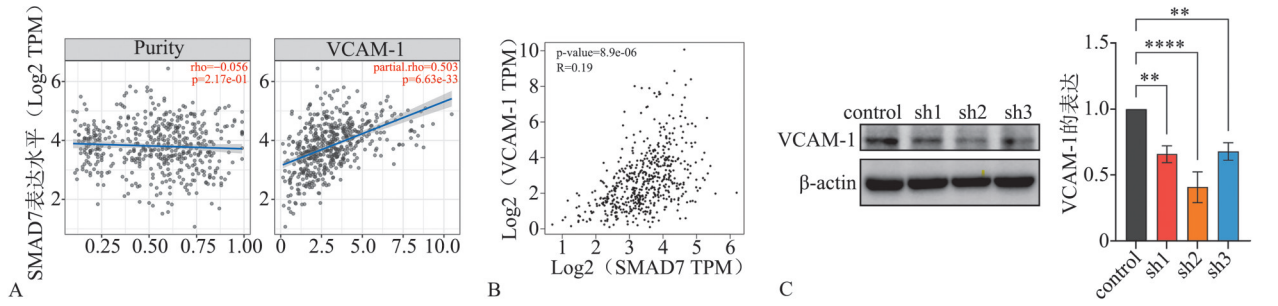
Fig 3 PPI of co-expressed genes of SMAD7 in HNSCC



A~C: 依次为GO分析共表达基因富集BP、CC、MF可视化网络; D: KEGG富集分析可视化网络。

图4 HNSCC中SMAD7的功能富集分析

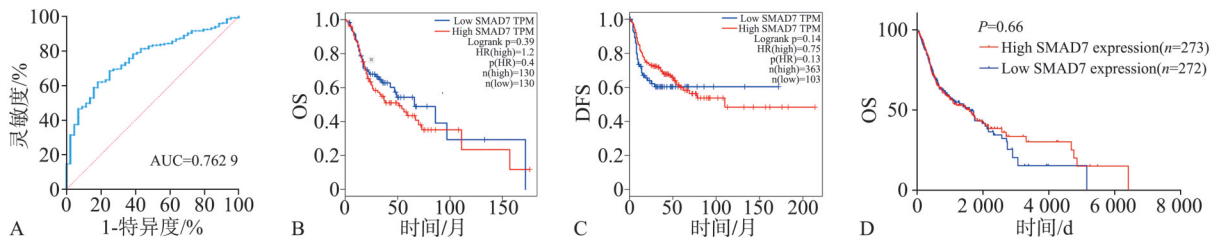
Fig 4 Functional enrichment analysis of SMAD7 in HNSCC



A、B: 在TIMER2.0/GEPIA数据库HNSCC中SMAD7表达与VCAM-1的相关性; C: Western blot显示, 敲低SMAD7可抑制VCAM-1水平。 ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图5 SMAD7表达与VCAM-1的相关性

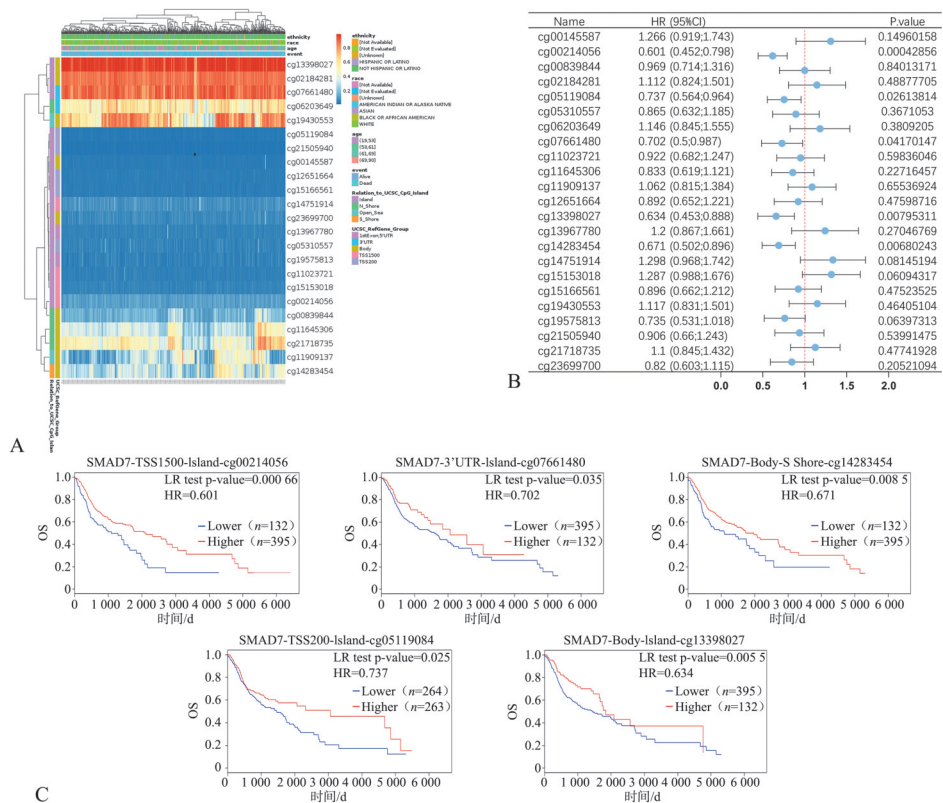
Fig 5 The correlation between SMAD7 expression and VCAM-1



A: UCSC Xena数据集中HNSCC患者的ROC曲线; B、C: GEPIA数据库中HNSCC患者的OS和DFS; D: UCSC Xena数据库中HNSCC患者的OS。

图6 SMAD7在HNSCC中的预后价值

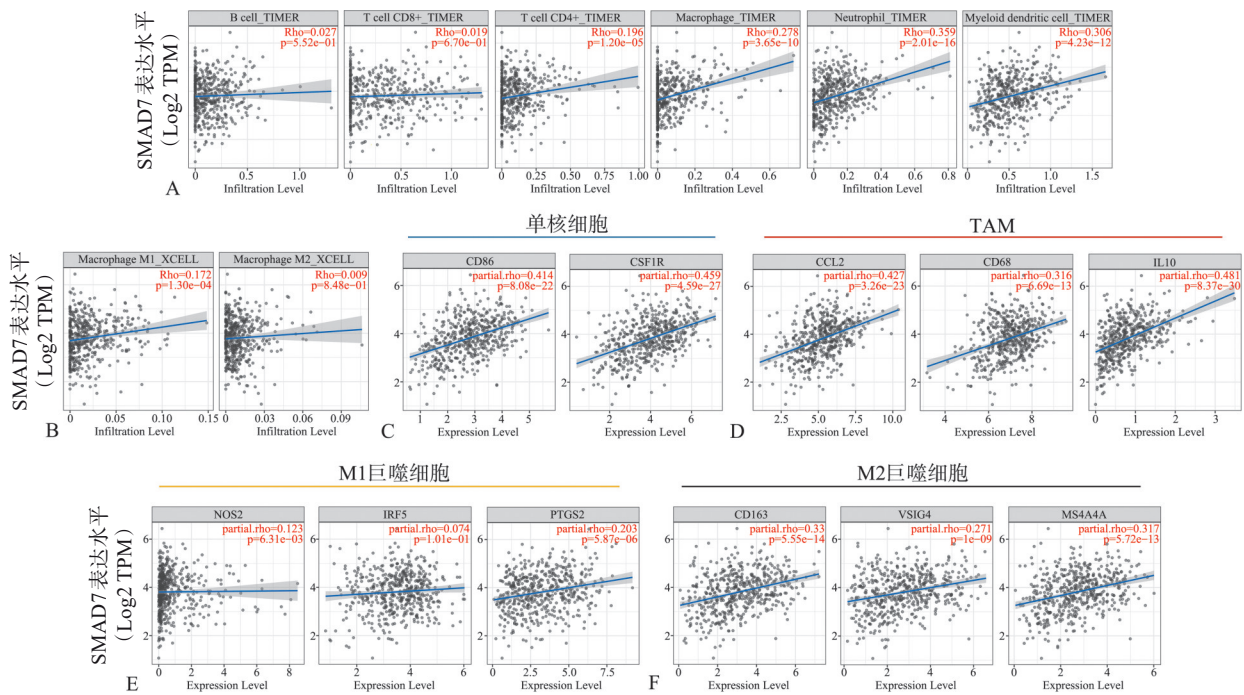
Fig 6 Prognostic value of SMAD7 in HNSCC



A: HNSCC中SMAD7 DNA甲基化位点变化热图; B: COX回归分析SMAD7 DNA甲基化位点与HNSCC预后的相关性(森林图); C: KM曲线比较Cg00214056、Cg07661480、Cg14283454、Cg05119084、Cg13398027位点DNA甲基化水平HNSCC患者OS。

图7 SMAD7在HNSCC中的甲基化分析

Fig 7 Methylation of SMAD7 in HNSCC



A: 通过TIMER分析SMAD7与HNSCC的免疫浸润水平相关; B: 通过XCELL分析SMAD7与HNSCC的M1和M2巨噬细胞浸润水平有关; C-F: 分别为SMAD7表达与单核细胞、TAM、M1和M2巨噬细胞基因标志物的相关性。

图 8 HNSCC中SMAD7表达与免疫浸润水平的相关性

Fig 8 Correlation of SMAD7 expression with immune infiltration level in HNSCC

3 讨论

HNSCC细胞可通过淋巴和血液系统转移，而转移会显著影响患者预后^[30]。对于在经过根治性手术后出现无法手术切除的复发性或转移性的HNSCC患者，非手术治疗策略至关重要^[31]。因此，迫切需要确定HNSCC精准的早期诊断生物标志物、预后生物标志物和治疗靶点。

SMAD7作为一种抑制性SMAD蛋白，与肿瘤的多种生物学行为相关。近年来，SMAD7在癌症中的作用已经在一些肿瘤中进行了研究，如SMAD7调节肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体（TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL）信号通路和增强癌症细胞对TRAIL介导凋亡的敏感^[15]。肿瘤坏死因子受体相关因子2能够通过增强SMAD特异性E3泛素蛋白连接酶2介导的轴抑制蛋白1泛素化降解来影响SMAD7的水平，从而影响其对TGF-β信号通路的抑制作用，导致信号通路的激活增强^[17]。SMAD7可能通过调控信号转导和转录激活因子3来间接影响X染色体连锁的凋亡抑制蛋白的表达，从而影响结肠细胞的迁移和细胞骨架的组织^[18]。此外，SMAD7还能通过诱导核转录因子κB（nuclear transcription factor κB, NF-κB）的

抑制因子的表达来抑制NF-κB的激活，从而减少炎症反应^[32]。然而，其在HNSCC中的表达模式、临床价值和生物学功能尚不清楚。本研究结果为了了解SMAD7在促进HNSCC进展中的病理作用及其作为HNSCC新诊断生物标志物和治疗靶点的潜在价值提供了见解。

数据库分析与细胞检测显示，在HNSCC的组织 and 细胞中SMAD7的表达高于正常组织和细胞，且与临床病理特征相关，尤其是年龄和性别，提示SMAD7可能在HNSCC的发生和发展中扮演重要角色。为了进一步评估SMAD7在HNSCC中的作用，对高表达SMAD7的HSC-4细胞进行基因沉默，并分别用CCK-8、Transwell和细胞划痕愈合实验验证，结果表明敲低SMAD7可抑制HNSCC细胞的增殖、侵袭和转移。

通过基因富集分析发现SMAD7与VCAM-1之间存在相关性。VCAM-1在多种生物学过程和疾病中发挥重要作用^[28-29]。VCAM-1的阻断可以作为消除癌细胞的替代策略^[27]。相关生物信息学和细胞生物学实验表明，SMAD7的表达与VCAM-1呈正相关，表明SMAD7可能通过调节VCAM-1表达在HNSCC中发挥致癌作用。后续将进一步研究VCAM-1在SMAD7调控HNSCC发生发展中的作用。

尽管在HNSCC中SMAD7表达较高,但本研究发现SMAD7表达较高的患者并没有较差的OS。这表明SMAD7可能不是一个预后不良的独立因素。而根据ROC曲线结果,SMAD7在区分HNSCC患者和健康个体方面具有很高的诊断价值,这表明SMAD7可以作为诊断的潜在生物标志物。此外,KM检验表明,SMAD7在HNSCC中的突变率较低,且与患者的OS和PFS无显著相关性,需要进一步调查以验证其对预后的影响。接下来,通过MethSurv数据库研究DNA甲基化状态,研究显示不同的DNA位点与OS不良显著相关。

近年来,肿瘤相关免疫细胞和肿瘤免疫疗法引起了人们的广泛关注^[33]。一些研究^[34]表明,免疫细胞浸润对HNSCC的预后有影响。SMAD7表达与HNSCC中巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞和CD4+T细胞的浸润水平之间存在着显著的正相关。此外,SMAD7表达与免疫细胞标志物基因之间的相关性暗示了SMAD7可能参与调节HNSCC的肿瘤免疫作用。TAM在肿瘤转移和治疗耐药性中起着关键作用,通常会促进未经治疗的肿瘤的进展^[35]。TAM具有显著的可塑性,可以是肿瘤支持性的(M2巨噬细胞)或抗瘤性的(M1巨噬细胞)^[36]。笔者推测SMAD7可能参与了M2型TAM的浸润过程。抑制SMAD7可能会减少TAM的浸润,尤其是M2-TAM的浸润,这可能成为免疫治疗的新思路。

综上所述,SMAD7在HNSCC中高表达,敲除SMAD7可以抑制HNSCC的进展,并诱导VCAM-1的下调,SMAD7可能通过调节VCAM-1促进HNSCC细胞增殖、侵袭和转移,但需要进一步的研究来证实这些结果并揭示潜在的机制。SMAD7遗传改变和DNA甲基化状态表明,SMAD7在HNSCC中具有重要的预后评估和临床病理诊断价值。SMAD7可通过调节肿瘤免疫细胞浸润水平从而影响HNSCC的发生发展。本研究表明SMAD7是HNSCC有前景的潜在诊断和免疫相关治疗靶点。但研究有一定的局限性,后续可开展更进一步的细胞生物学实验,探索SMAD7在HNSCC中的相关通路及其作用机制,验证其作为早期诊断、预后评估标志物及进行相关免疫治疗的可行性。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突

[参考文献]

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007

[J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1): 43-66.

[2] McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015[J]. Adv Nutr, 2016, 7(2): 418-419.

[3] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[4] Ayub B, Qureshi FA, Hassan NH, et al. Optimising head and neck cancer patient management: the crucial contributions of multidisciplinary tumour board decision-making[J]. Ecancermedicalscience, 2024, 18: 1710.

[5] Caruntu A, Yang SF, Acero J. New insights for an advanced understanding of the molecular mechanisms in oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(13): 6964.

[6] Chen W, Wu X, Hu J, et al. The translational potential of miR-26 in atherosclerosis and development of agents for its target genes ACC1/2, COL1A1, CPT1A, FBP1, DGA-T2, and SMAD7[J]. Cardiovasc Diabetol, 2024, 23(1): 21.

[7] He H, Wang H, Chen X, et al. Treatment for type 2 diabetes and diabetic nephropathy by targeting Smad3 signaling[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(1): 200-217.

[8] Li Y, Zhao Y, Zhong G, et al. Vascular smooth muscle cell-specific miRNA-214 deficiency alleviates simulated microgravity-induced vascular remodeling[J]. FASEB J, 2024, 38(1): e23369.

[9] Li W, Bai P, Li W. UHRF1 inhibition mitigates vascular endothelial cell injury and ameliorates atherosclerosis in mice via regulating the SMAD7/YAP1 axis[J]. Mol Immunol, 2024, 170: 119-130.

[10] Gong M, Guo Y, Dong H, et al. Trigonelline inhibits tubular epithelial-mesenchymal transformation in diabetic kidney disease via targeting Smad7[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 168: 115747.

[11] Huang C, Peng M, Zhong X, et al. The correlation between the expression of Smad2/3 and Smad7 proteins in blood neutrophils and asthma disease[J/OL]. Minerva Med, 2024. doi: 10.23736/S0026-4806.23.08756-6.

[12] Gaikwad AV, Eapen MS, Dey S, et al. TGF- β 1, pSmad2/3, Smad-7, and β -Catenin are augmented in the pulmonary arteries from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): role in driving endothelial-to-mesenchymal

- transition (EndMT)[J]. *J Clin Med*, 2024, 13(4): 1160.
- [13] Liu C, Ni L, Li X, et al. SETD2 deficiency promotes renal fibrosis through the TGF- β /Smad signalling pathway in the absence of VHL[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(11): e1468.
- [14] Luo H, Fu L, Wang X, et al. Salvianolic acid B ameliorates myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy by deubiquitinating Smad7[J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 161.
- [15] Luiz-Ferreira A, Pacifico T, Cruz AC, et al. TRAIL-sensitizing effects of flavonoids in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(23): 16596.
- [16] Chen Z, Wang Y, Lu X, et al. The immune regulation and therapeutic potential of the SMAD gene family in breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 6769.
- [17] Li Z, Zhao J, Wu Y, et al. TRAF2 decrease promotes the TGF- β -mTORC1 signal in MAFLD-HCC through enhancing AXIN1-mediated Smad7 degradation[J]. *FASEB J*, 2024, 38(4): e23491.
- [18] Colella M, Iannucci A, Maresca C, et al. SMAD7 sustains XIAP expression and migration of colorectal carcinoma cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2024, 16(13): 2370.
- [19] Chen J, Hu J, Li X, et al. Enhydrin suppresses the malignant phenotype of GBM via Jun/Smad7/TGF- β 1 signalling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 226: 116380.
- [20] Zhao Z, Zhang H, Zhang F, et al. Circular RNA sirtuin-1 restrains the malignant phenotype of non-small cell lung cancer cells via the microRNA-510-5p/SMAD family member 7 axis[J]. *Acta Biochim Pol*, 2023, 70(4): 855-863.
- [21] Dai T, Qiu S, Gao X, et al. Circular RNA circWnk1 inhibits the progression of gastric cancer via regulating the miR-21-3p/SMAD7 axis[J]. *Cancer Sci*, 2024, 115(3): 974-988.
- [22] Osborn L, Hession C, Tizard R, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes [J]. *Cell*, 1989, 59(6): 1203-1211.
- [23] Kawano T, Yanoma S, Nakamura Y, et al. Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1, and VCAM-1 as tumor markers in head and neck cancer[J]. *Am J Otolaryngol*, 2005, 26(5): 308-313.
- [24] Mazzoni A, Maggi L, Montaini G, et al. Human T cells interacting with HNSCC-derived mesenchymal stromal cells acquire tissue-resident memory like properties[J]. *Eur J Immunol*, 2020, 50(10): 1571-1579.
- [25] Jia M, Li Q, Guo J, et al. Deletion of BACH1 attenuates atherosclerosis by reducing endothelial inflammation[J]. *Circ Res*, 2022, 130(7): 1038-1055.
- [26] Zhang S, Xie B, Wang L, et al. Macrophage-mediated vascular permeability via VLA4/VCAM1 pathway dictates ascites development in ovarian cancer[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(3): 140315.
- [27] Pinho S, Wei Q, Maryanovich M, et al. VCAM1 confers innate immune tolerance on haematopoietic and leukaemic stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(3): 290-298.
- [28] Zhang D, Bi J, Liang Q, et al. VCAM1 promotes tumor cell invasion and metastasis by inducing EMT and transendothelial migration in colorectal cancer[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1066.
- [29] Huang J, Deng Q, Wang Q, et al. Exome sequencing of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(10): 1117-1121.
- [30] Wang K, Zhang R, Li C, et al. Construction and assessment of an angiogenesis-related gene signature for prognosis of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 284.
- [31] Sato M, Enokida T, Fujisawa T, et al. Induction chemotherapy with paclitaxel, carboplatin, and cetuximab (PCE) followed by chemoradiotherapy for unresectable locoregional recurrence after curative surgery in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1420860.
- [32] Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [33] Leone RD, Powell JD. Metabolism of immune cells in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(9): 516-531.
- [34] Boschert V, Boenke J, Böhm AK, et al. Differential immune checkpoint protein expression in HNSCC: the role of HGF/MET signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(13): 7334.
- [35] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 445-455.
- [36] Bronte V, Murray PJ. Understanding local macrophage phenotypes in disease: modulating macrophage function to treat cancer[J]. *Nat Med*, 2015, 21(2): 117-119.