DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.004

・基础研究・

水疱性口炎病毒对小鼠乳腺癌4T1细胞荷瘤小鼠抗肿瘤免疫、移植瘤 生长与肺转移的影响

李玉迁^{1a},徐庆胜^{1a},魏洪^{1a,1b},王皞²,王硕石³,蒋立娜^{1a},袁心怡^{1c}(1.贵州医科大学 a.基础医学院 微生物学教研室; b.基础医学国家级实验教学中心;c.临床医学院,贵州 贵阳 550025;2.贵州省人民医院 急诊外科,贵州 贵阳 550005;3.贵州中医药大学第二附属医院红岩院区 中心实验室,贵州 贵阳 550003)

目 的:探究野生型水疱性口炎病毒印第安纳株(VSV-IN)对小鼠三阴性乳腺癌4T1细胞移植模型小鼠的免疫调节及 [摘 要] 肿瘤转移的影响。 方法: VSV 以 MOI=1、MOI=10、MOI=100 感染4T1 细胞12、24、48 h 后, CCK-8 法检测4T1 细胞死亡率, 划痕愈 合实验检测细胞迁移能力,qPCR检测细胞中E-cadherin、MMP-2、MMP-9 mRNA的表达。于雌性BALB/c小鼠脂肪垫接种 1×10⁶个/mL的4T1细胞0.1mL,构建4T1细胞荷瘤小鼠模型,待小鼠肿瘤体积达200mm³,分别向移植瘤内注射PBS、紫杉 醇(TAX)(15 mg/kg)、VSV-IN(1×10⁶ pfu/只),每周1次。给药4次后,处死小鼠、剥离完整移植瘤组织,测量肿瘤体积及质量,肺组 织病理切片经H-E染色后观察肿瘤肺部转移结节,流式细胞术检测脾组织中T细胞亚群比例,ELISA法检测小鼠血清IL-6及 TNF-α水平,利用GEPIA在线分析乳腺肿中迁移相关蛋白mRNA的表达,免疫组化法检测肿瘤中MMP-2、MMP-9与E-cadherin 的表达,利用蛋白-蛋白对接技术预测 VSV-IN的G蛋白、M蛋白与 ERK2、E-cadherin 的亲和力。结果: 经 MOI=10、100 的 VSV-IN 处理 48 h 后,4T1 细胞死亡率显著高于对照组(均 P<0.01);与对照组相比,VSV-IN 组(MOI=10)细胞迁移率 明显降低(P<0.01), MMP-9 mRNA的相对表达量明显降低(P<0.05); 与对照组小鼠相比, VSV-IN 组移植瘤生长较对照组减缓 且终点体积显著减小(P<0.05), VSV-IN组小鼠肺转移结节数量显著减少[(12.86±1.86) vs (24±3.67)个, P<0.01], 脾内CD4⁺T、 CD8⁺ T 细胞比例显著升高(均 P<0.05),血清 TNF-α、IL-6含量显著升高(均 P<0.01);GEPIA分析发现在乳腺癌中E-cadherin、 MMP-9表达水平均高于癌旁组织(P<0.05); VSV-IN组小鼠肿瘤细胞内MMP-9表达明显低于对照组(P<0.05); VSV-IN的G、 M蛋白与 ERK2 的结合自由能分别为 - 11.7 kcal/mol、 - 6.4 kcal/mol。结论: 野生型 VSV-IN 可抑制 4T1 细胞荷瘤小鼠的移植瘤 生长及转移,这可能与其促进抗肿瘤免疫及调控迁移相关蛋白表达有关。 [关键词] 野生型水疱性口炎病毒;三阴性乳腺癌;4T1细胞;迁移;蛋白-蛋白对接

[中图分类号] R737.9; R730.54 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385x(2024)05-0452-10

Effects of vesicular stomatitis virus on anti-tumour immunity, growth of xenografts, and lung metastasis in mouse mammary carcinoma 4T1 cells tumor-bearing mice

LI Yuqian^{1a}, XU Qingsheng^{1a}, WEI Hong^{1b}, WANG Hao², WANG Shuoshi³, JIANG Lina^{1a}, YUAN Xinyi^{1c}(1. a. Department of Microbiology, Basic Medical College; b. National Experimental Teaching Center for Basic Medicine; c. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Emergency surgery of Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550005, Guizhou, China; 3. Experimental Center of Hongyan District, the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of wild-type vesicular stomatitis virus strain (VSV-IN) on immunomodulation and tumour metastasis in mouse triple negative breast cancer (TNBC) 4T1 cell transplantation model mice. **Methods:** After VSV-IN infected 4T1 cells with MOI=1, MOI=10 and MOI=100 for 12, 24 and 48 h, 4T1 cell mortality was detected by CCK-8 method, migration ability by scratch healing assay, and the expressions of E-cadherin, MMP-2 and MMP-9 mRNA by qPCR. The fat pads of female BALB/c mice were inoculated with 0.1 mL of 4T1 cells with a cell density of 1×10^6 cells/mL to construct a 4T1 cell-loaded mouse model. When the tumour volume reached 200 mm³, the mice were injected intratumorally with PBS, taxol (TAX) (15 mg/ kg), and VSV (1×10^6 pfu) once a week, respectively. After 4 administrations, mice were executed, stripped of intact grafted tumour tissues, and tumour volume and mass were measured. Histopathological sections of the lungs were stained with H-E, and tumour

 $-\oplus$

[[]基金项目] 贵州省卫生健康委-科学技术基金(No.gzwkj2023-280);贵州省科技计划项目[No.黔科合基础-ZK(2024)一般125]

[[]作者简介] 李玉迁(1999—),男,硕士生,主要从事溶瘤病毒治疗乳腺癌相关研究。E-mail:3041234811@qq.com

[[]通信作者] 魏洪, E-mail: 263676470@qq.com

metastatic nodules of the lungs were observed. The proportion of T-cell subpopulations in the spleen was detected by flow cytometry. The levels of serum IL-6 and TNF- α were detected by ELISA. The expression levels of migration-related proteins in mammary gland tumours were analysed by using the online analysis of GEPIA. The expressions of MMP-2, MMP-9 and E-cadherin in mouse tumours were detected by immunohistochemistry, and the affinity of G and M proteins of VSV-IN and ERK2 and E-cadherin was predicted by protein-protein docking technology. Results: The mortality rate of 4T1 cells after 48 hours of VSV treatment at MOI=10 and 100 were significantly higher than that of the control group (P<0.01). Compared with that of the control group, the cell migration rate of the VSV-IN group (MOI=10) was significantly lower (P < 0.01), and the relative expression of MMP-9 mRNA was significantly lower (P < 0.05). Compared with those in the mice of the control group, transplanted tumours in the mice of the VSV-IN group grew more slowly, and their endpoint volume was significantly reduced (P<0.05). The number of lung metastatic nodules in the mice of the VSV group was significantly less than that of the control group ([12.86±1.86] vs [24±3.67], P<0.01). The proportions of splenic CD4⁺ T and CD8⁺ T cells in the VSV group were significantly higher (both P<0.05). The serum TNF- α and IL-6 levels were significantly higher (both P< 0.01). GEPIA tool analysis revealed that the expression levels of E-cadherin and MMP-9 were higher in breast cancer tissues than in paracancerous tissues (P < 0.05). The expression of MMP-9 in the tumour cells of the mice in the VSV-IN group was significantly lower than that in the control group (P < 0.05). The binding free energies of G and M proteins of VSV-IN to ERK2 were -11.7 kcal/mol and -6.4 kcal/mol, respectively. Conclusion: Wild-type VSV-IN inhibits the growth and metastasis of transplanted tumours in 4T1 tumorbearing mice, which may be related to its promotion of anti-tumour immunity and modulation of the expression of migration-related proteins.

[Key words] wild-type vesicular stomatitis virus Indiana strain (wild-type VSV-IN); triple negative breast cancer (TNBC); 4T1 cell; migration; protein-protein docking

 $-\oplus$

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(5): 452-461. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.004]

2020年,全球新发女性乳腺癌225万例,自此,女 性乳腺癌成为发病率最高的癌症印。乳腺癌细胞的 迁移、侵袭是乳腺癌复发和转移的关键原因,而上皮 间质转化(EMT)在肿瘤细胞迁移、侵袭过程中发挥 着显著的调节作用四,在EMT过程中,细胞的上皮钙 黏素(E-cadherin)水平的下降¹³及基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、MMP-9水平的增加都可以导致细胞的黏 附力降低,从而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭[46]。在 肿瘤细胞中,MMP-2、MMP-9可被RAS/ERK2信号通 路调控^[7]。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)约占乳腺癌的15%~20%,具有更高复 发转移风险[8-10],现有放、化疗及内分泌治疗等手段难 以攻克TNBC,亟待出现新的治疗方法。溶瘤病毒疗 法是一种多途径杀伤肿瘤的治疗手段,其中,水疱性 口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)因复制周期 短、对正常细胞无影响等特点成为溶瘤病毒疗法中 的焦点^[11]。目前,VSV的基因改造株在结肠癌^[12-13]、胰 腺癌[14]、乳腺癌[15-17]等肿瘤中表现出抑瘤活性,例如, VSV的M蛋白基因的51位的甲硫氨酸缺失及被精 氨酸取代分别获得 VSV-M51R^[12]、VSV- △ M51^[14]从而 提高其安全性;通过改造VSV的G蛋白使其获得靶 向乳腺癌的能力^[18];VSV-△M51通过与NK-T细胞疗 法[19]、舒尼替尼等联合应用获得更强的抑瘤活性[20]。 尚少见野生型 VSV 治疗 TNBC 的研究报道。本研究 以4T1细胞(小鼠TNBC细胞)移植瘤模型小鼠为实 验对象,探究野生型VSV印第安纳(Indiana, IN)株 (VSV-IN)处理对4T1细胞移植瘤生长、转移的影响,

观察VSV-IN对模型小鼠脾脏T细胞亚群比例、血清炎症因子及肿瘤迁移相关蛋白(MMP-2、MMP-9、 E-Cadhein)表达的影响,探索TNBC生物疗法,为基于VSV-IN的TNBC研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

BALB/c小鼠30只,雌性,4~5周龄,体质量 (20±2)g,无特定病原体级别,购自北京华阜康生物 科技股份有限公司[实验动物使用许可证号:SCXK (京)2019-0008],饲养于贵州医科大学实验动物中心 [实验动物使用许可证号:SYXK(贵)2023-0002],昼 夜交替12h饲养。本实验方案经贵州医科大学实验 动物伦理委员会审核批准,审批号为No.2200336。

VSV-IN株、Vero细胞(非洲绿猴肾细胞)、4T1细胞(小鼠TNBC细胞)均为本实验室保存。

胎牛血清、10×青-链霉素均购自BI公司,高糖 DMEM、胰蛋白酶EDTA均购自美国Gibco公司,紫 杉醇(taxol,TAX;纯度>98%)购自上海麦克林公司, 异氟烷购自瑞沃德生命科技有限公司,4%多聚甲醛 溶液购自雷根生物公司,IL-6、TNF-a ELISA试剂盒 均购自杭州联科生物技术公司,淋巴细胞分离液购 自索莱宝公司,T细胞(CD3、CD4、CD8)亚群流式抗 体购自Elabscience公司,MMP-2抗体购自proteintech 公司,MMP-9抗体购自SAB公司,E-Cadhein抗体购 自Bioworld公司,免疫组化染色试剂盒购自北京博 奥森生物技术公司,流式细胞仪(FACS Canto II)购 · 454 ·

自美国BD公司,酶标仪购自美国Bio Tek公司,倒置显微镜购自美国Bio-Rad公司。

1.2 细胞及病毒的体外培养

参照文献[16]中方法,所有细胞均以含10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和100 µg/mL 链霉素的DMEM完全培养基培养。用Vero细胞扩增VSV-IN。病毒滴度测定:Vero细胞以8×10³个/孔接种于96孔板,随后加入10倍梯度稀释的VSV-IN病毒液共培养,逐天于显微镜下观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),根据公式计算VSV-IN的半数组织培养感染剂量(50% tissue culture infectivedose, TCID₅₀)。TCID₅₀=高于50%病变的病毒最高稀释度的对数+距离比例。

1.3 CCK-8法检测VSV-IN对4T1细胞的抑制活性

于96孔板接种对数期4T1细胞(1×10⁴个/孔),细 胞贴壁后,处理组加入不同滴度VSV-IN(MOI=1、10、 100),对照组加入等体积培养基。培养12、24、48 h, 每孔加入100 μL检测液(90 μL DMEM+10 μL CCK-8),处理2h后,在450 nm处检测光密度(D)值, 计算细胞死亡率来反应VSV的细胞抑制活性。

细胞死亡率=[(对照组D值-实验组D值)/(对照 组D值-空白孔D值)]×100%。

1.4 划痕愈合实验检测VSV-IN对4T1细胞迁移能力的影响

取对数期4T1细胞(5×10⁴个)接种于12孔板,待 细胞贴壁后,使用10μL移液器吸头在培养板孔中央 画一条直线,洗去脱落的细胞,设置对照组(加入等 体积培养基)、VSV-IN处理组(MOI=10),观察细胞 在24h的迁移情况,根据公式计算细胞迁移率。

细胞迁移率=(0 h时划痕面积-24 h时划痕面积/0 h时划痕面积×100%。

1.5 qPCR 法检测 VSV-IN 对 4T1 细胞迁移相关基因 mRNA 表达的影响

按照 RNA 提取试剂盒说明提取 VSV-IN 处理的 4T1 细胞总 RNA。采用 cDNA 合成试剂盒进行逆 转录,以鼠 GAPDH 为内参对照,采用 2^{-AACT}法计算 E-cadherin、MMP-2、MMP-9的mRNA 表达水平。引 物序列见表1。

表1 qPCR所用引物序列

基因名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
E-cadherin	CTCAAGCTCGCGGATAACCA	AATCCTGCTGCCACGATTC
MMP-2	CTGCAGGGTGGTGGTCATAG	GCCCAGCCAGTCTGATTTGA
MMP-9	CGCTCATGTACCCGCTGTAT	CCGTGGGAGGTATAGTGGGA
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTGGAPDH	GGGGTCGTTGATGGCAACA

 $- \oplus$

1.6 小鼠肿瘤模型的建立

参考文献[17,21]中方法,调整4T1细胞密度为 1×10⁶个/mL,以0.1 mL/只接种于小鼠右侧的第二对 乳腺脂肪垫,待移植瘤体积达200 mm³时,将荷瘤小鼠 随机分为对照组、TAX组及VSV-IN组,每组10只,分 别瘤内注射PBS、TAX(15 mg/kg)、VSV-IN(1×10⁵ pfu/ mL)100 μL,每周给药1次,共4次,每2 d记录小鼠体 质量及移植瘤体积。末次给药后第7天,1.5%异氟烷 麻醉后,颈椎脱臼法处死小鼠,完整剥离移植瘤组织 并测量其体积及质量。

1.7 小鼠肺表面转移结节及组织病理结构观察

剥离小鼠肺,计数肺表面转移结节数量。对部分 肺组织按常规方法脱水、透明、石蜡包埋、切片(5μm), 进行H-E染色,显微镜下观察转移灶组织病理变化。计 算肺指数:肺指数=(肺质量/小鼠体质量)×100%。

1.8 流式细胞术检测4T1细胞荷瘤小鼠脾组织中T 细胞亚群比例

采用研磨法制备小鼠脾组织单细胞悬液,裂解 红细胞后,加入抗CD3抗体(1:50)室温避光处理 20 min,用PBS洗涤3次,上流式细胞仪进行检测,用 Fowjo软件分析分泌CD4⁺和CD8⁺T细胞占比情况, 实验重复3次。计算肺指数:脾指数=(脾质量/小鼠 体质量)×100%。

1.9 ELISA 法检测 4T1 细胞荷瘤小鼠血清中 IL-6及 TNF-α 的含量

小鼠麻醉后,摘眼球取血,4℃放置2h,之后 1000×g离心10min,取上清液。按照ELISA试剂盒 说明书检测血清中IL-6及TNF-α含量,实验重复3次。 1.10 利用GEPIA2.0分析乳腺癌中迁移相关蛋白的 表达水平

参照文献[22]中的方法,访问 GEPIA 数据库(http: //gepia.cancer.pku.cn/),选择"Expression DIY"模块的 "Boxplot"功能,对乳腺癌及癌旁组织中 EMT 相关基 因(包括 E-cadherin、N-cadherin、MMP-2、MMP-3、 MMP-9、Snail-1、Snail-2、Z0-1、Twist、Vinmentin)的 mRNA 相对表达量进行分析。

1.11 免疫组织化学(IHC)法检测移植瘤瘤组织中 MMP-2、MMP-9、及E-Cadhein的表达

将移植瘤组织制成石蜡切片,使用 MMP-2 抗体、MMP-9 抗体、E-Cadhein 抗体(1:3 000 稀释)对石

蜡切片进行 IHC 染色,4 ℃处理过夜后,用 PBS 清 洗3次,之后滴加 HRP 标记的二抗(1:5 000 稀释) 37 ℃下处理 30 min,再用 PBS 洗涤3次,于湿盒中进 行3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色及苏木精复染,拍照记录,使用 ImageJ 1.53 软件 对阳性区域进行量化处理,选择阳性率(阳性区域面 积占比)作为分析对象。阳性率=阳性区域面积/图片 总面积×100%。

1.12 蛋白-蛋白相互作用预测

参照文献[23]中的方法,从PDB数据库下载 VSV-IN的G蛋白(PDB ID: 5i2m)、VSV的M蛋白 (PDB ID:11g7)、ERK2 蛋白(PDB ID:1tvo)、 E-cadherin (PDB ID: 6vel)的蛋白质结构。使用 Discovery Studio 19.1 软件去除受体蛋白和配体蛋白 的结晶水、金属离子等,并为蛋白分子加上末端 氢原子。以ERK2或E-cadherin为受体蛋白,VSV-IN的G蛋白或M蛋白为配体蛋白,使用Discovery Studio 19.1 软件中的 ZDOCK 模块预测复合物结构。 设置"Angular Step Size"为15,"RMSD Cutoff"为6.0, "Interface Cutof" 为 9.0, "Maximum Number of Clusters"为60,"Top Poses"为2000,其它参数均为缺 省值,进行对接。采用 ZRANK 方法对 ZDOCK 对接 得分进行重新排序。最后,基于 CHARMM polar H 力场采用 RDOCK 方法对 ZDOCK 结果进行重新优 化和打分,选出前5个E RDOCK得分较低的构象 复合物,利用PDBePISA对E RDOCK得分较低的构 象的结合自由能进行分析。使用pymol软件对将 E RDOCK得分最低的对接模型进行可视化分析。 1.13 统计学处理

主要实验均独立重复3次。采用 Graphpad prism 7软件处理所有数据,符合正态分布的计量数据以*x*±s表示,多组间比较采用单因素方差分析,组

间两两比较采用*t*检验。Kaplan-Meier法绘制生存曲线。以*P*<0.05或*P*<0.01表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 VSV-IN处理抑制4T1细胞增殖

CCK-8检测结果(图1)显示,在VSV-IN处理4T1 细胞48h后,MOI=100和10组的细胞死亡率均显著 高于对照组(均P<0.01),细胞经VSV-IN以MOI=10 处理后死亡率超过20%,以MOI=100处理后死亡率 超过60%,说明VSV-IN可以抑制4T1细胞生长,且抑 制效果与病毒量有关联。



2.2 VSV-IN处理抑制4T1细胞的迁移能力

划痕愈合实验检测结果(图2A、B)显示,VSV-IN 处理24h后,与对照组相比,VSV-IN处理组迁移率显 著下降(P<0.0001)。qPCR检测结果(图2C)显示, MOI=10的VSV-IN处理4T1细胞48h后,MMP-9 的mRNA相对表达量显著低于对照组(P<0.05), E-cadherin、MMP-2的表达量呈下降趋势但于对照组 相比并无明显差异。



A: 划痕愈合实验观察 MOI=10的 VSV-IN 处理24h后4T1 细胞的迁移情况(×100);B: 对划痕愈合实验结果数据的量化统计; C:qPCR 检测 VSV-IN 对 4T1 细胞迁移相关蛋白的 mRNA 的相对表达量的影响。与对照组或 MOI=0 组相比,*P<0.05、**P<0.01。 图2 VSV-IN 处理对 4T1 细胞迁移能力与迁移相关蛋白表达的影响

 \oplus

2.3 VSV-IN处理抑制移植瘤生长并提高荷瘤小鼠 生存率

测量小鼠肿瘤体积(图3A、B)和质量,结果显示, 各组小鼠肿瘤体积均呈上升趋势,与对照组相比,TAX 组、VSV-IN组小鼠肿瘤的体积增长缓慢且终点体积小 于对照组,差异有统计学意义(均P<0.05)。VSV-IN组 小鼠移植瘤质量显著低于对照组[(1.01±0.44)vs(1.86± 0.54)g,P<0.05],TAX组移植瘤质量(1.5±0.43)g较对照 组有所降低,但并无显著差异。VSV-IN组小鼠的生存 率显著高于对照组(P<0.05,图3C)。



A:剥离下来的小鼠移植瘤;B:小鼠移植瘤体积变化曲线;C:荷瘤小鼠生存曲线。 与对照组相比,*P<0.05,**P<0.01。 图3 VSV-IN处理对移植瘤生长及荷瘤小鼠生存率的影响

2.4 VSV-IN处理降低荷瘤小鼠的肺、脾指数

与对照组相比,VSV-IN组与TAX组的肺指数均显 著降低[(0.21±0.03)%、(0.21±0.06)%vs(0.29±0.10)%, P<0.05];VSV-IN组的脾指数明显低于对照组[(0.86± 0.06)%vs(1.04±0.09)%,P<0.05],而TAX组的脾指数 为(0.70±0.24)%,与对照组相比无明显差异。

2.5 VSV-IN处理影响4T1细胞荷瘤小鼠肺转移结节数量及组织结构

统计小鼠肺转移结节数量,结果(图4A、B)显示,与对照组相比,TAX组与VSV组小鼠的肺转移结节数量均明显减少[(12.5±1.87)、(12.86±1.86) vs

(24±3.67)个,P<0.01]。H-E染色结果(图4C)显示, 对照组小鼠肺组织结构异常,肺可见明显转移灶,癌 细胞胞核异型性较大,而VSV-IN组与TAX组小鼠肺 组织结构较完整,肺泡结构清晰。

2.6 VSV-IN处理影响荷瘤小鼠脾中T细胞亚群 比例

流式细胞术检测结果(图5)显示,与对照组相 比,TAX组、VSV-IN组小鼠脾脏CD4⁺T、CD8⁺T细胞 比例上升(均P<0.05);TAX组CD4⁺/CD8⁺T细胞比值 显著低于对照组(P<0.05),VSV-IN组与对照组无明 显差异(P>0.05)但显著高于TAX组(P<0.05)。



A:肺部表面结节,圆圈圈出部分示肺转移结节;B:肺部表面结节数量;C:肺组织病理变化(H-E,×100),箭头所指为肺转移灶。 与对照组相比,**P<0.01。

图4 荷瘤小鼠肺表面转移结节与肺组织病理变化



A:荷瘤小鼠脾脏T细胞亚群流式图;B:各T细胞亚群占比;C:CD4⁺/CD8⁺T细胞比值。
与对照组相比,^{*}P<0.05、^{**}P<0.01;与TAX组相比,[△]P<0.05。
图5 VSV-IN对荷瘤小鼠脾内T细胞亚群比例的影响

2.7 VSV-IN处理提高荷瘤小鼠血清中IL-6与TNF-α 的水平

ELISA 检测结果显示,与对照组相比,TAX组、 VSV-IN组(小鼠血清中IL-6含量均显著升高[(67.89± 10.84)、(67.89±10.84)vs(2.47±1.46)pg/mL,均P<0.01]; VSV-IN组血清中TNF-α水平显著升高[(77.19± 13.56) vs (34.76±11.22) pg/mL, P<0.01], TAX组 [(39.24±19.15)pg/mL]无明显变化。

2.8 迁移相关蛋白在乳腺癌组织中的表达

GEPIA分析结果(图6)显示,E-cadherin、MMP-9 在乳腺癌中表达水平高于癌旁组织(均P<0.05),而 Vinmentin、Twist在乳腺癌中表达降低(P<0.05)。

2.9 VSV-IN处理对移植瘤组织中MMP-2、MMP-9、E-cadherin表达影响

IHC检测结果(图7)显示,与对照组相比,VSV-IN组小鼠移植瘤组织中MMP-9的表达水平显著降低(P<0.05),而E-cadherin与MMP-2的表达无明显差异(均P>0.05)。

2.10 利用蛋白-蛋白相互作用技术预测 VSV-IN G 蛋白、M蛋白与ERK2、E-cadherin 的亲和力

上述结果表明VSV-IN处理可下调移植瘤组织的MMP-9表达,这可能与VSV-IN对MMP-9上游蛋白的作用有关,而在移植瘤组织中未观察到E-cadherin

表达的变化,因此推测 VSV-IN 可能直接作用于 E-cadherin。为探究 VSV-IN 的主要抗肿瘤蛋白 G、M 与 MMP-9上游蛋白 REK2 及 E-cadherin 的亲和力,对 其进行蛋白-蛋白相互作用分析。

如表2所示,VSV的G蛋白与ERK2、E-cadherin及 VSV的M与ERK2、E-cadherin最优模型的ZDOCK 打分分别为17.6、17.5、15.78、19.3,E_RDOCK打分为 - 18.4998、- 14.3976、- 27.2144、- 21.6039,结合自由 能为-11.7、- 6.4、- 8.8、- 7.0 kcal/mol,对并其进行可 视化分析,结果如图10所示,VSVM可通过ALA240、 GLN42等残基与ERK2的HIS61、ARG194等残基形成 氢键相互作用,从而实现两者的稳定结合。

3 讨 论

溶瘤病毒激活肿瘤部位免疫功能是溶瘤病毒肿瘤 杀伤作用的主要机制。表达呼肠孤病毒融合相关小穿 膜蛋白的VSV-p14可通过上调脾和肿瘤中活化的CD4⁺ T细胞、CD8⁺T细胞的比例强化抗肿瘤免疫^[20];VSV显 著增强小鼠IFN-γ⁺CD4⁺T细胞反应^[24]。研究^[18]表明, VSV-ΔM51感染可增加4T1细胞中IL-6、TNF-α和 IFN-αmRNA的表达。在本研究中观察到野生型VSV-IN增加了4T1细胞荷瘤小鼠脾组织中CD4⁺T细胞、CD8⁺ T细胞的比例及血清中TNF-α、IL-6的含量,与前述





研究结果类似,提示野生型VSV-IN可增强小鼠抗肿瘤免疫。



0

E-cahderin

乳腺癌的转移与复发与肿瘤细胞迁移、侵袭能力密切相关。EMT在TNBC细胞迁移、侵袭过程中扮演了重要的角色,在此过程中通常伴随E-cadherin 丢失及MMP-2与MMP-9等的表达增加^[46]。有研究^[25] 表明,野生型VSV可下调结肠癌细胞中MMP-9的表达;此外,VSV-ΔM51的M蛋白表现出对4T1荷瘤 小鼠肿瘤中MMP-2^[26]、MMP-9^[16]表达的抑制作用,表

MMP-9

明VSV可能通过调控EMT过程影响肿瘤细胞迁移、 侵袭。本研究中观察到VSV-IN可以下调4T1荷瘤 小鼠肿瘤中MMP-9的表达,并且蛋白-蛋白对接结果 提示VSV-IN的G、M蛋白与E-cadherin及MMP-2、 MMP-9上游调控蛋白ERK2具有互作可能,提示 VSV-IN对4T1细胞的抗转移作用可能与其对EMT通 路关键蛋白的调控相关。

MMP-2

MMP-9

 \oplus

表2 ZDOCK和RDOCK对接结果							
受体蛋白及 其PDB-ID	配体蛋白及 其PDB-ID	ZDOCK 得分	E_RDOCK 得分	氢键相互作用	静电相互作用		
ERK2	VSV-IN G	17.6	-18.4998	A:HIS61:HD1-B:ALA240:O	A:LYS259:HZ1-B:ASP274:OD2 B:ABG206:NH1 A:GLU1 86:OE2		
(1tvo)	(5i2m)			A.GLN62.HR-B.ALA240.O	B:ASD241:OD2 A:HIS61		
				A:ARG194·HH22-B:GLY38·O	A·LYS259·HZ1-B·ASP274·OD2		
				A·HIS232·HD1-B·ASN31·O			
				B:ASN34:HN-A:HIS232:NE2			
				B:GLY38:HN-A:LYS231:O			
				B:THR1 87:HN-A:GLU1 86:OE2			
				B:ARG206:HH11-A:GLU1 86:OE1			
ERK2	VSV-IN M	17.5	-14.3976	A:HIS61:HD1-C:MET145:O	A:ARG67:NH1-C:HIS227:OCT2		
(1tvo)	(1197)			A:HIS61:HD1-C:LYS147:O;	A:LYS1 51:NZ-C:HIS227:OCT2		
(1000)	(1.67)			A:GLN62:HN-C:MET145:O	C:LYS1 47:NZ-A:GLU60:OE2		
				A:THR63:HN-C:MET145:O	C:ARG202:NH1-A:GLU1 86:OE2		
				A:ARG191:HH11-C:SER226:OG	A:ARG67:NH1-C:HIS227:OCT2		
				A:ARG191:HH12-C:SER226:OG			
				A:LYS231:HZ1-C:ILE1 64:O			
				A:HIS232:HD1-C:GL U203:OE2			
				C:GLN58:HE22-A:ASP336:O			
				C:ARG102:HH12-A:GLY34:O			
F 11 '	VOUDIC	15 70	27.2144	C:VAL212:HN-A:GLU1 86:OE2	DIVENT DADDIZ OD		
E-cadherin	VSV-IN G	15.78	-27.2144	D:SER109:HN-B:SER233:O	D:LYS115:HZ1-B:ASP13/:OD2		
(6vel)	(5i2m)			D:SEK109:HG-B:SEK253:O	B:ARG332:HH12-D:GLU1 94:0E2		
				D: A \$N121:HN B:CI U255:O	B:AKG529:NH1-D:ASP191:0D2 B:L VS401:NZ D:ASP238:0D2		
				D.GI N1 42:HE21-B:GI V340:0	D.L 13401.112-D.ASI 238.0D2		
				D:GL N202:HE21-B:GL U406:OE2			
				B:THR214:HG1-D:VAL104:O			
				B:LYS217:HZ3-D:GLN124:O			
				B:ARG230:HH22-D:LEU122:O			
				B:SER258:HG-D:GLU1 14:OE2			
				B:THR265:HG1-D:VAL 240:O			
				B:ARG329:HH22 - D:ASP191:OD2			
				B:LYS401:HZ1-D:AL A173:O			
				B:LYS401:HZ2-D:VAL199:O			
				B:VAL404:HN-D:THR200:OG1			
E-cadherin	VSV-IN M	19.3	-21.6039	D:ASN1 13:HD22-C:ARG1 59:O	C:ARG1 60:HH11 - D:ASP204:OD2		
(6vel)	(11g7)			D:LYS115:HZ2-C:GLU130:OE1	D:LYS11 5:NZ - C:GLU130:OE2		
				D:LYS115:HZ3-C:GLN128:O	D:LYS206:NZ - C:GLU1 56:OE2		
				D:LY \$206:HZ1-C:PRO1 55:0	C:ARGI 60:NHI - D:GLUI /0:OE2.		
				D:SER303:HN-C:PRO1 55:0			
				D.THR305·HN_C·MET98·SD			
				C:GLN128:HN2-D:GLY116:O			
				C:ARG159:HN-D:ASP204:O			
				C:ARG159:HH11-D:ASN203:O			
				C:ARG159:HH22-D:GLN202:OE1			
				C:ARG160:HH12-D:ASP204:O			
				C:LYS1 68:HZ2-D:THR1 64:O			
				C:LYS1 68:HZ3-D:THR1 64:O			
				C:ARG159:CD-D:ASN203:O			

φ

注:表中相互作用两栏中A、B、C、D分别代表ERK2、VSV-ING、VSV-INM、E-cadherin;ZDOCK:基于快速傅里叶转化相关性技术的 刚性蛋白对接算法;RDOCK:一种基于CHARMm的能量优化过程,用于优化ZDOCK所寻找到的蛋白蛋白复合物的结合构型。

 $- \oplus -$

· 459 ·

· 460 ·



A、B:绿色结构为VSV-IN G蛋白,天蓝色结构为ERK2蛋白; C、D:绿色结构为VSV-IN M蛋白,天蓝色结构为ERK2蛋白; E、F:绿色结构为VSV-IN M蛋白,天蓝色结构为E-cadherin蛋 白;G、H:绿色结构为VSV-IN G蛋白,天蓝色结构为 E-cadherin蛋白。红色虚线代表氢键作用。 图8 蛋白对接模式图及蛋白结合界面处关键氨基酸残基相 互作用

综上所述,野生型VSV(VSV-IN株)可以抑制 4T1荷瘤小鼠肿瘤的生长及转移,在TNBC的治疗中 有着广泛应用前景,而VSV抗肿瘤免疫及转移的的 具体调控机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

- SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, 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): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] LÜÖND F, SUGIYAMA N, BILL R, *et al.* Distinct contributions of partial and full EMT to breast cancer malignancy[J]. Dev Cell, 2021, 56(23): 3203-3221.e11. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.11.006.
- [3] NA T Y, SCHECTERSON L, MENDONSA A M, et al. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(11): 5931-5937. DOI: 10.1073/pnas.1918167117.
- [4] WANG J, CAI H, LIU Q L, *et al.* Cinobufacini inhibits colon cancer invasion and metastasis *via* suppressing Wnt/β -catenin signaling pathway and EMT[J]. Am J Chin Med, 2020, 48(3): 703-718. DOI: 10.1142/S0192415X20500354.
- [5] WU H T, LIN J, LIU Y E, et al. Luteolin suppresses androgen receptor-positive triple-negative breast cancer cell proliferation and metastasis by epigenetic regulation of MMP9 expression via the AKT/mTOR signaling pathway[J/OL]. Phytomedicine, 2021, 81:

153437 [2024-04-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33352494/. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153437.

- [6] HWANG K E, KIM H J, SONG I S, *et al.* Salinomycin suppresses TGF-β1-induced EMT by down-regulating MMP-2 and MMP-9 *via* the AMPK/SIRT1 pathway in non-small cell lung cancer[J]. Int J Med Sci, 2021, 18(3): 715-726. DOI: 10.7150/ijms.50080.
- [7] LIU H P, WANG H J, DONG A J, *et al.* The inhibition of gastric cancer cells' progression by 23, 24-dihydrocucurbitacin E through disruption of the ras/raf/ERK/MMP9 signaling pathway[J/OL]. Molecules, 2022, 27(9): 2697 [2024-04-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35566048/. DOI: 10.3390/molecules27092697.
- [8] LIN Z Y, PENG R, SUN Y, *et al.* Identification of ribosomal protein family in triple-negative breast cancer by bioinformatics analysis[J/ OL]. Biosci Rep, 2021, 41(1): BSR20200869[2024-04-08]. https:// pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33305312/. DOI: 10.1042/BSR20200869.
- [9] CURIGLIANO G, BURSTEIN H J, WINER E P, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017[J]. Ann Oncol, 2017, 28(8): 1700-1712. DOI: 10.1093/annonc/mdx308.
- [10] CRONIN K A, SCOTT S, FIRTH A U, *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, part 1: national cancer statistics[J]. Cancer, 2022, 128(24): 4251-4284. DOI: 10.1002/cncr.34479.
- [11] KOYAMA A H. Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus[J]. Virus Res, 1995, 37(3): 285-290. DOI: 10.1016/0168-1702(95)00026-m.
- [12] DAY G L, BRYAN M L, NORTHRUP S A, et al. Immune effects of M51R vesicular stomatitis virus treatment of carcinomatosis from colon cancer[J]. J Surg Res, 2020, 245: 127-135. DOI: 10.1016/j. jss.2019.07.032.
- [13] GOAD D W, BRESSY C, HOLBROOK M C, et al. Acquired chemoresistance can lead to increased resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus[J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 24: 59-76. DOI: 10.1016/j.omto.2021.11.019.
- [14] GAO Y, WHITAKER-DOWLING P, GRIFFIN J A, et al. Recombinant vesicular stomatitis virus targeted to Her2/neu combined with anti-CTLA4 antibody eliminates implanted mammary tumors[J]. Cancer Gene Ther, 2009, 16(1): 44-52. DOI: 10.1038/cgt.2008.55.
- [15] BOURGEOIS-DAIGNEAULT M C, ROY D G, FALLS T, et al. Oncolytic vesicular stomatitis virus expressing interferon- γ has enhanced therapeutic activity[J/OL]. Mol Ther Oncolytics, 2016, 3: 16001 [2024-04-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27119116/. DOI: 10.1038/mto.2016.1.
- [16] SHI W, TANG Q Q, CHEN X C, et al. Antitumor and antimetastatic activities of vesicular stomatitis virus matrix protein in a murine model of breast cancer[J]. J Mol Med, 2009, 87(5): 493-506. DOI: 10.1007/s00109-009-0444-5.
- [17] GAO Y H, BERGMAN I. Vesicular stomatitis virus (VSV) G glycoprotein can be modified to create a Her2/neu-targeted VSV that eliminates large implanted mammary tumors[J/OL]. J Virol, 2023, 97(6): e0037223 [2024-04-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih. gov/37199666/. DOI: 10.1128/jvi.00372-23.
- [18] GEBREMESKEL S, NELSON A, WALKER B, et al. Natural killer T cell immunotherapy combined with oncolytic vesicular stomatitis virus or reovirus treatments differentially increases survival in mouse models

of ovarian and breast cancer metastasis[J/OL]. J Immunother Cancer, 2021, 9(3): e002096[2024-04-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33722907/. DOI: 10.1136/jitc-2020-002096.

- [19] JHA B K, DONG B H, NGUYEN C T, et al. Suppression of antiviral innate immunity by sunitinib enhances oncolytic virotherapy[J]. Mol Ther, 2013, 21(9): 1749-1757. DOI: 10.1038/mt.2013.112.
- [20] LE BOEUF F, GEBREMESKEL S, MCMULLEN N, et al. Reovirus FAST protein enhances vesicular stomatitis virus oncolytic virotherapy in primary and metastatic tumor models[J]. Mol Ther Oncolytics, 2017, 6: 80-89. DOI: 10.1016/j.omto.2017.08.001.
- [21] 王欣荣, 刘登湘, 刘丽华, 等. 5-FU 对小鼠乳腺癌 4T1 细胞株中肿 瘤干细胞样细胞的富集作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(5): 478-485. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.003.
- [22] YANG L, XU Q, LI J N. Prognostic impact of ARHGAP43 (SH3BP1) in acute myeloid leukemia[J]. J Formos Med Assoc, 2024: S0929-S6646(24)00186-4. DOI: 10.1016/j.jfma.2024.04.002.
- [23] SHABIR A, QAYOOM H, HAQ B U, et al. Exploring HMMR as a therapeutic frontier in breast cancer treatment, its interaction with various cell cycle genes, and targeting its overexpression through

specific inhibitors[J/OL]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1361424 [2024-04-08]. https://doi.org/10.3389/fphar. 2024.1361424. DOI: 10.3389/fphar.2024.1361424.

- [24] ZHANG M, DONG C S, XIONG S D. Heterologous boosting with recombinant VSV-846 in BCG-primed mice confers improved protection against *Mycobacterium* infection[J]. Hum Vaccin Immunother, 2017, 13
 (4): 816-822. DOI: 10.1080/21645515.2016.1261229.
- [25] JIANG H F, LI H P. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J/OL]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 149[2024-04-08]. https://pubmed. ncbi.nlm.nih.gov/33568081/. DOI: 10.1186/s12885-021-07860-2.
- [26] QI X R, DU L C, CHEN X C, et al. VEGF-D-enhanced lymph node metastasis of ovarian cancer is reversed by vesicular stomatitis virus matrix protein[J]. Int J Oncol, 2016, 49(1): 123-132. DOI: 10.3892/ ijo.2016.3527.

[收稿日期]	2023-12-16	[修回日期]	2024-04-09
[本文编辑]	黄静怡		

· 461 ·