



DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.004

· 基础研究 ·

基于蛋白质组学技术探讨麻疹减毒活疫苗 191 株抑制三阴性乳腺癌细胞增殖的可能机制

姚梦玮^{1a,b}, 李玉迁^{1a,b}, 徐庆胜^{1a,b}, 方小菡^{1c}, 魏洪^{1a,b,c}, 迟茜文^{1c}, 刘蕊²(1. 贵州医科大学 a. 基础医学院 微生物学教研室; b. 贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室; c. 基础医学国家级实验教学中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 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)

[摘要] 目的: 基于蛋白质组学技术探讨麻疹减毒活疫苗 191 株(MV-Hu191)在体内外对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231、4T1 细胞的影响及其作用机制。方法: 采用 CCK-8 法检测 MV-Hu191 对 MDA-MB-231 和 4T1 细胞增殖的影响; 液相色谱-质谱联用技术分析 MV-Hu191 处理对 MDA-MB-231 细胞中蛋白质谱的影响, 多重数据库筛选蛋白质谱中的典型差异蛋白并进行 GO、KEGG、亚细胞定位与功能注释。瘤内注射 1×10^6 TCID₅₀ MV-Hu191 干预 4T1 细胞移植瘤模型小鼠, 流式细胞术检测小鼠脾组织中 T 细胞亚群, ELISA 法检测小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 含量。结果: 体外实验结果表明, MV-Hu191 具有抑制 MDA-MB-231 和 4T1 细胞增殖的作用, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。蛋白质组学分析结果显示, MV-Hu191 作用 MDA-MB-231 细胞后明显上调蛋白质有 38 个、下调有 12 个; 差异表达的蛋白质主要参与细胞黏附、信号受体激活、细胞代谢、应激反应等生物学过程, 22 个差异蛋白亚细胞定位位于细胞外, KEGG 功能分类显示与免疫调节功能相关的差异蛋白最多且均为上调蛋白, 包括 C4A、C8B、SERPINF2、A2M、SERPIN1C、CTSB、SERPING1、C5; PPI 预测发现免疫相关差异蛋白与 CD4、CD8、TNF-α 及 IL-6 相互关联。体内实验结果显示, MV-Hu191 干预组小鼠脾组织中 CD4⁺ T 细胞数量略高于对照组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值明显高于对照组($P < 0.05$), 血清 TNF-α 和 IL-6 含量显著上升(均 $P < 0.01$)。结论: MV-Hu191 显著抑制 MDA-MB-231、4T1 细胞增殖及拮抗 4T1 细胞荷瘤小鼠成瘤性, 其机制可能是 MV-Hu191 通过激活免疫效应分子实现抗肿瘤作用。

[关键词] 麻疹溶瘤病毒; MV-Hu191; 三阴性乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; 4T1 细胞; 细胞增殖; 蛋白质组学

[中图分类号] R737.9; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)07-0568-09

Possible mechanism of 191 measles attenuated live vaccine strains inhibiting the proliferation of triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells based on proteomics technology

YAO Mengwei^{1a,b}, LI Yuqian^{1a,b}, XU Qingsheng^{1a,b}, FANG Xiaohan^{1c}, WEI Hong^{1a,b,c}, CHI Qianwen^{1c}, LIU Rui² (1. a. Department of Microbiology, Basic Medical College; b. Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Education Department of Guizhou Province; c. National Experimental Teaching Center for Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. 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 effect and mechanism of live attenuated measles vaccine strain 191 (MV-Hu191) on triple negative breast cancer MDA-MB-231 and 4T1 cells *in vitro* and *in vivo* based on proteomics. Methods: CCK-8 method was used to analyze the effect of MV-Hu191 on the proliferation of MDA-MB-231 and 4T1 cells. Liquid chromatography-mass spectrometry was used to analyze the effect of MV-Hu191 treatment on protein spectrum in MDA-MB-231 cells. Multiple databases were used to screen typical differentially expressed proteins, followed with GO, KEGG, subcellular localization and functional annotation. Intratumoral injection of 1×10^6 TCID₅₀ MV-Hu191 was used to intervene the growth of 4T1 cell transplanted tumor in mice. Flow cytometry was applied to detect T cell subpopulations in splenic tissue, and ELISA was used for the detection of serum levels of TNF-α and IL-6. Results: *In vitro* experiments showed that MV-Hu191 could significantly inhibit the proliferation of MDA-MB-231 and 4T1 cells ($P < 0.01$). Proteomic analysis showed that 38 proteins were significantly upregulated while 12 proteins were downregulated in MDA-MB-231 cells after MV-Hu191 treatment. The differentially

[基金项目] 贵州省卫生健康委科学技术基金(No. GZWKJ2023-280); 2021 年国家级大学生创新创业训练项目(No. 202110660028); 2020 年省级大学生创新训练项目(No. S202010660053); 贵州省教育厅平台项目(No. 黔教技[2022]019 号)

[作者简介] 姚梦玮(1995—), 女, 硕士生, 主要从事溶瘤病毒治疗乳腺癌的相关研究, E-mail: 1649294804@qq.com

[通信作者] 魏洪, E-mail: 263676470@qq.com



expressed proteins were mainly involved in the biological processes of cell adhesion, signaling receptor activation, cell metabolism, and stress responses. The subcellular localization of 22 differentially expressed proteins was located outside the cell. The KEGG functional classification showed that the most differentially expressed proteins were related to immunomodulatory functions and they were all upregulated, including C4A, C8B, SERPINF2, A2M, SERPINC1, CTSB, SERPING1, and C5; PPI prediction found immune-related differential proteins were associated with CD4, CD8, TNF- α and IL-6. *In vivo* experiments showed that the number of CD4 $^{+}$ T cells in spleen tissues of mice in the MV-Hu191 intervention group was higher than that in the control group, but the difference was not significant ($P>0.05$). The ratio of CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T cells and the serum levels of TNF- α and IL-6 in the MV-Hu191 intervention group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** MV-Hu191 significantly inhibits the proliferation of MDA-MB-231 and 4T1 cells and antagonizes the tumorigenicity in mice bearing 4T1 cell xenograft. The mechanism may be that MV-Hu191 achieve its anti-tumor effect by activating immune effector molecules.

[Key words] measles oncolytic virus; MV-Hu191; triple negative breast cancer; MDA-MB-231 cell; 4T1 cell; cell proliferation; proteomics

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(7): 568-576. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.004]

2020 年起, 乳腺癌发病率位居全球第一, 新发病例占总体癌症的 11.7%^[1]。占乳腺癌 15%~20% 的三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 由于缺乏雌激素受体、孕激素受体和表皮生长因子受体 2, 无法接受内分泌治疗, TNBC 的高转移性及患者对化疗药物耐受使其疗效不佳^[2-4]。溶瘤病毒能选择性识别肿瘤细胞并致使其裂解而不影响正常细胞, 已成为一类新兴的抗肿瘤治疗方法。麻疹病毒 (measles virus, MV) 作为最早应用的溶瘤病毒, MV-Edm、MeV-SCD 等麻疹病毒株已被证实具有抑制乳腺癌 MDA-MB-231、MDA-MB-468 细胞增殖的作用^[5-6]。在中国, MV-Hu191 作为疫苗被广泛应用于预防麻疹病毒感染近 50 年, 是一种有效安全的生物制剂^[7-8]。自 2012 年起先后报道 MV-Hu191 对胃癌^[9]、结肠癌^[10]、肾母细胞癌^[11]等肿瘤具有抑制其增殖能力, 但未见 MV-Hu191 株治疗乳腺癌的相关报道。本研究基于蛋白质组学技术研究 MV-Hu191 处理人 MDA-MB-231 细胞后对细胞蛋白质谱表达的影响, 并利用乳腺癌 4T1 细胞小鼠移植瘤模型初步探讨 MV-Hu191 抑制移植瘤生长及其可能的机制, 旨在为 TNBC 提供一种新的生物治疗的思路, 为麻疹溶瘤病毒开发为临床治疗药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及实验动物

MV-Hu191 株、绿猴肾上皮细胞 Vero (贵州省疾控中心赠), 人 TNBC 细胞株 MDA-MB-231、鼠 TNBC 细胞株 4T1 (贵州医科大学临床研究中心赠)。BALB/c 小鼠, 雌性, 30 只, 5~6 周龄, 体质量 (18±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; 许可证号: SCXK(京)2019-0008; 饲养温度为 22~25 °C, 湿度为 50%~80%, 昼夜交替 12 h 饲养。本实验经由贵州医科大学伦理委员会审核批准(审批号为 2200011)。

1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清、青霉素/链霉素均购自以色列 BI 公司, 高糖 DMEM、胰蛋白酶 EDTA 均购自美国 Gibco 公司, 紫杉醇 (paclitaxel, 纯度>98%) 购自上海麦克林公司, CCK-8 试剂购自美国 APExBIO 公司, IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒均购自杭州联科生物技术公司, T 细胞亚群 (CD3、CD4、CD8) 流式抗体均购自 Elabscience 公司, 磷酸化酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、辣根过氧化物酶均购自美国 Merck Millipore 公司, 碘乙酰胺、尿素、二硫苏糖醇、三氟乙酸、三氯乙酸、 β -巯基乙醇、乙二胺四乙酸、碳酸氢铵、四乙基溴化铵、三氯甲烷、丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、烟酰胺、四甲基乙二胺、Seppro® Rat Spin Columns 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司, BCA 试剂盒、考马斯亮蓝均购自上海碧云天公司, 2-D Quant 试剂盒购自美国 GE Healthcare 公司, 淋巴细胞分离液、DNA 提取酚试剂、PAGE 银染试剂盒购自北京 Solarbio 公司, TMT 标记试剂、Pierce Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns 购自美国 ThermoFisher Scientific 公司, 小鼠二抗、兔二抗均购自美国 Pierce 公司, ProteoMiner™ Protein Enrichment Small-Capacity Kit 购自美国 Bio-Rad 公司。全自动化学发光图像分析系统 5200 购自上海 Tanon 公司, 流式细胞仪购自美国 BD 公司, 倒置显微镜购自美国 Bio-Rad 公司, Bruker TimsTOF Pro 质谱仪购自美国 Bruker 公司。

1.3 细胞培养及病毒扩增

MDA-MB-231 细胞、4T1 细胞、绿猴肾上皮 Vero 细胞在含有 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。培养 Vero 细胞, 感染 MV-Hu191 1 周后收集病毒。采用聚乙二醇法浓缩病毒, 离心后弃上清, 以无血清的 DMEM 重悬沉淀, 分装后放入 -80 °C 冰箱保存。滴度测定: 按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

1.4 CCK-8 法检测 MV-Hu191 对乳腺癌细胞增殖的影响 对数期 MDA-MB-231、4T1 细胞接种 1×10⁴ 个/孔于



96孔板,每组6个复孔。待细胞贴壁后,处理组加入不同感染复数的(MOI=1、MOI=5、MOI=10)MV-Hu191,对照组加入等量的培养液。分别培养24、48、72 h,每孔加入10 μL CCK-8检测液,反应2 h后,在490 nm处检测光密度(D)值,计算D平均值来代表细胞增殖水平。

1.5 SDS-PAGE筛选 MV-Hu191 敏感的乳腺癌细胞

将对数期MDA-MB-231、4T1细胞接种 1×10^7 个/孔于T25细胞培养瓶,待细胞贴壁后,处理组加入不同浓度的(MOI=1、MOI=10)MV-Hu191,对照组加入等量的培养液。培养48 h后弃去培养液,预冷PBS洗3次后收集细胞,提取总蛋白,加入4倍体积预冷裂解缓冲液(含8 mol/L尿素,1%蛋白酶抑制剂,3 μmol/L TSA, 50 mmol/L NAM),超声裂解。4 °C, 12 000×g 离心10 min,去除细胞碎片取上清,BCA试剂盒进行蛋白质浓度测定,SDS-PAGE分离总蛋白质,评估MV-Hu191作用4T1和MDA-MB-231细胞后其蛋白质分离程度。

1.6 MV-Hu191 处理后 MDA-MB-231 细胞总蛋白的胰酶酶解

分别提取MOI=0(对照组)和MOI=10(MV-Hu191)作用的MDA-MB-231细胞总蛋白,取等量,用裂解液将体积调整至一致。缓慢加入20% TCA,涡旋混匀,4 °C沉淀2 h。4 500×g 离心5 min,弃上清,用预冷的丙酮洗涤沉淀2~3次。晾干沉淀后加入终浓度200 mmol/L的TEAB,超声打散沉淀,以1:50的比例加入胰蛋白酶,酶解过夜。加入二硫苏糖醇(DTT)使其终浓度为5 mmol/L,56 °C还原30 min。之后加入碘乙酰胺使其终浓度为11 mmol/L,室温避光反应15 min。

1.7 液相色谱-质谱联用分析 MV-Hu191 处理后 MDA-MB-231 细胞蛋白质谱的变化

胰酶酶解获取的细胞总蛋白肽段用液相色谱流动相A相溶解,使用NanoElute超高效液相系统进行分离。流动相A为含0.1%甲酸和2%乙腈的水溶液,流动相B为含0.1%甲酸的乙腈-水溶液。液相梯度设置:0~10 min, 9%~24% B; 10.0~14.0 min, 24%~35% B; 14.0~17.0 min, 35%~80% B; 17.0~20.0 min, 80% B; 流速维持在1 000 nL/min。肽段经由超高效液相系统分离后被注入Capillary离子源中进行电离,然后进TimsTOF Pro(Bruker)质谱进行数据采集。离子源电压设置为2.0 kV,肽段母离子及其二级碎片都使用TOF进行检测和分析。数据采集模式使用数据非依赖平行累积串行碎裂(DIA-PASEF)模式,一级质谱扫描范围设置为100~1 700 m/z,一张一级质谱采集后进行10次PASEF模式采集,二级质谱扫描以100~1 700 m/z为区间,每25个m/z为窗口。

1.8 MDA-MB-231 细胞蛋白质谱数据的鉴定及其生物信息学分析

根据质谱数据使用DIA-NN(v 1.8)搜索引擎,使

用软件默认参数进行检索。数据库为Homo_sapiens_9606_SP_20220107.fasta(20376条序列),采用深度学习算法构建理论谱图库,添加了反库以计算随机匹配造成的假阳性率(false positive rate, FDR);蛋白、肽段和PSM鉴定的FDR设置为1%,获得可鉴定蛋白质后进行如下操作:(1)质谱质控鉴定:对可鉴定蛋白质质谱数据使用PTM-BIO主成分分析软件工具进行分析评估质控水平;(2)差异蛋白质的筛选:根据质谱定量结果进行两组间差异倍数(fold change, FC)计算和t检验P值计算,按照设定的阈值进行差异筛选,根据ANOVA P筛选多组间差异蛋白质;(3)差异蛋白的生物信息学分析:EggnoG-Mapper软件(v2.1.6)进行Gene Ontology注释分析(GO分析);PSORTb软件(v3.0)对四类原核生物中鉴定到蛋白质进行亚细胞结构预测分析;Pfam数据库及相应的PfamScan工具对鉴定到的蛋白质进行蛋白结构域注释;KEGG通路数据库对KEGG功能及蛋白通路进行注释,STRING数据库对差异蛋白质进行蛋白互作网络(protein-protein interaction, PPI)分析,筛选出特定实验条件下的相关调控蛋白质。

1.9 MV-Hu191 对 4T1 细胞小鼠移植瘤生长的影响

取对数期4T1细胞,调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,于小鼠腹壁左侧第2对乳头皮下注射100 μL瘤细胞悬液制备肿瘤模型。每2 d测量模型小鼠体质量及肿瘤长径和宽径,并计算肿瘤体积(肿瘤体积=0.5×长径×宽径²)。将模型小鼠分为对照组(注射PBS)、MV-Hu191组(注射 1×10^6 TCID₅₀)、紫杉醇组(15 mg/kg),每组6只小鼠。当4T1荷瘤小鼠肿瘤体积到达100~200 mm³时,每2 d瘤内注射药物100 μL,连续给药5次。28 d后麻醉处死小鼠,取肿瘤组织计算瘤重。

1.10 流式细胞术检测荷瘤小鼠脾组织中T细胞亚群的变化

无菌条件下摘取各组荷瘤小鼠脾脏制备脾细胞悬液,加于淋巴细胞分离液上,900×g离心30 min,离心后吸取第二层环状乳白色细胞,洗涤细胞;250×g离心10 min,弃上清,PBS清洗细胞3次;第3次250×g离心10 min,弃上清后加入CD3、CD4、CD8荧光素标记抗体各10 μL,混匀置于4 °C避光处理30 min,加入细胞染色缓冲液重悬细胞,300×g离心5 min,弃上清,加入200 μL细胞染色缓冲液重悬细胞,流式细胞仪进行检测和分析。

1.11 ELISA 法检测荷瘤小鼠血清 IL-6、TNF-α 含量

荷瘤小鼠麻醉后眼球取血,4 °C凝集30 min,1 000×g离心10 min,吸取样本按IL-6、TNF-α ELISA试剂盒说明步骤进行操作,使用酶标仪在450 nm下测定D值。

1.12 统计学处理

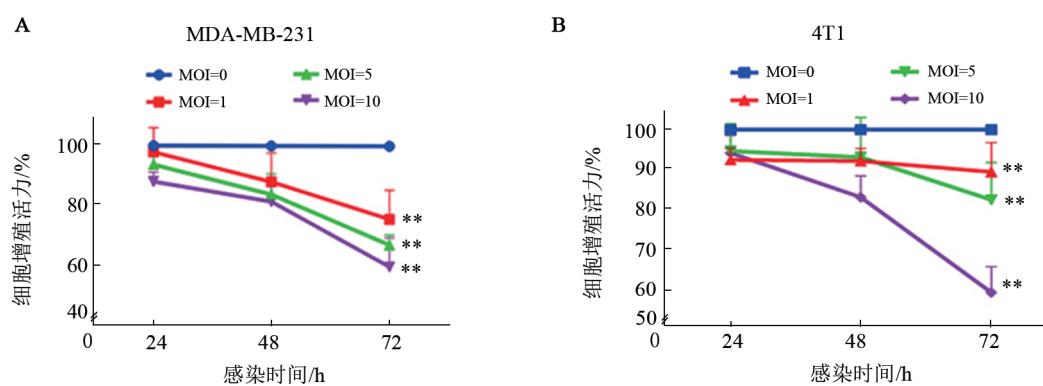
所有实验均重复实验3次。数据采用SPSS 20.0软件进行处理,采用Graphpad Prism 8.0软件进行作图,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MV-Hu191 对 TNBC 细胞 MDA-MB-231 和 4T1

增殖的影响

CCK-8实验结果(图1)显示,不同感染复数(MOI=1、5、10)MV-Hu191处理MDA-MB-231、4T1细胞48 h后,与对照组相比,各组细胞增殖活力均明显下降(均 $P<0.01$);在72 h时,MOI=10的MV-Hu191处理后MDA-MB-231、4T1细胞增殖活力均低于60%,表明MV-Hu191具有抑制MDA-MB-231和4T1细胞增殖的作用,并呈时间和剂量依赖性。

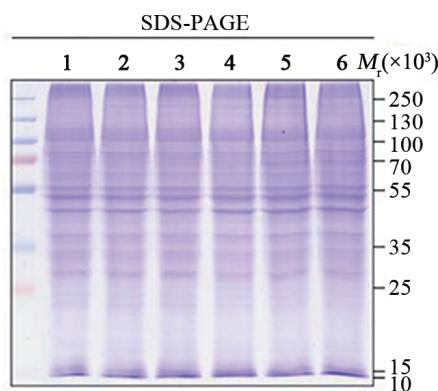


与 MOI=0 组相比, ** $P<0.01$ 。

图1 MV-Hu191对MDA-MB-231(A)、4T1(B)细胞增殖的影响

2.2 MDA-MB-231 细胞对 MV-Hu191 更敏感

提取 MV-Hu191(MOI=1、5、10)处理后的MDA-MB-231、4T1细胞总蛋白,用SDS-PAGE分离显示,各组细胞蛋白质条带清晰、均一。与MOI=0组相比,实验组细胞蛋白质在55 000~100 000分子量范围内条带种类增加,其中MOI=10处理MDA-MB-231细胞分离蛋白质的条带增加数量最明显(图2),因此选择MOI=0和MOI=10处理的MDA-MB-231细胞进行后续蛋白组学分析。

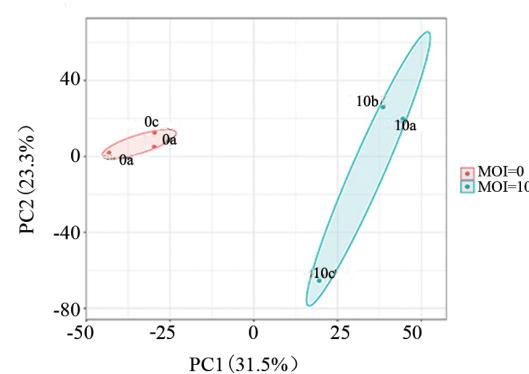


1、2、3泳道代表MV-Hu191分别在MOI=0、1、10处理4T1细胞;4、5、6泳道代表MV-Hu191分别在MOI=0、1、10处理的MDA-MB-231细胞。

图2 SDS-PAGE 分离 MDA-MB-231 和 4T1 细胞的总蛋白质

2.3 MV-Hu191 处理后 MDA-MB-231 细胞的蛋白质谱数据质量可靠

PTM-BIO 主成分分析软件对液相色谱-质谱获取的MDA-MB-231细胞蛋白质谱数据进行主成分分析(图3),图中样本间的聚集程度代表样本的差异性大小,聚集程度越好代表定量重复性越好。结果表明,提取的蛋白质样本具有良好的分离效果和重复性,可以用于后续试验。



横轴PC1是I类特征,纵轴PC2是II类特征。红色的圆圈表示MV-Hu191感染复数是MOI=0,蓝色的圆圈表示MV-Hu191感染浓度是MOI=10,各组设置3次重复,分别以a、b、c代表。

图3 MV-Hu191感染MDA-MB-231细胞的蛋白质谱定量主成分分析



2.4 MV-Hu191 处理后 MDA-MB-231 细胞蛋白质数据中筛查到 50 个差异明显的蛋白质

液相色谱-质谱联用分析数据结果显示, MV-Hu191 作用后的 MDA-MB-231 细胞蛋白质谱中发现有 4 834 个蛋白质表达发生了变化。以变化超

过 1.5 倍作为显著上调的阈值, 小于 1/1.5 作为显著下调阈值, 共筛查到有 38 个上调蛋白质, 12 个下调蛋白质, 表 1 列出了其上调最明显的 10 个蛋白质和下调最明显的 5 个蛋白质。

表 1 MDA-MB-231 细胞蛋白质谱的变化最大的蛋白质

蛋白质编号	基因名称	蛋白质描述	比值	P 值	调节类型
Q969R2	OSBP2	氧甾醇结合蛋白 2	2.82	0.00***	上调
P02766	TTR	甲状腺运载蛋白	2.03	0.00***	上调
Q8WXE9	STON2	石蛋白 2	1.97	0.00***	上调
P02768	ALB	白蛋白	1.91	0.00***	上调
Q9H8G2	CAAP1	半胱氨酸蛋白酶活性抑制剂 1	1.85	0.00***	上调
Q9UBY5	LPAR3	溶血磷脂酸受体 3	1.84	0.00***	上调
P02749	APOH	糖蛋白 1	1.82	0.00***	上调
P02788	LTF	乳转铁蛋白	1.80	0.00***	上调
P48426	PIP4K2A	磷脂酰肌醇 5-磷酸 4-2 型激酶	1.77	0.01	上调
P01008	SERPINC1	抗凝血酶 III	1.77	0.00***	上调
P35908	KRT2	II 型细胞骨架 2	0.54	0.00***	下调
P48668	KRT6C	II 型细胞骨架 6C	0.45	0.00***	下调
P04264	KRT1	II 型细胞骨架 1	0.40	0.00***	下调
P13647	KRT5	II 型细胞骨架 5	0.39	0.00***	下调
P13645	KRT10	I 型细胞骨架 10	0.33	0.00***	下调

2.5 MDA-MB-231 细胞蛋白质谱中差异蛋白质的功能分类

2.5.1 GO 二级分类

基于 EggNOG 数据库按照生物学过程、细胞组分和分子功能对差异蛋白质进行功能分类, 显示有 16~38 个蛋白质参与生物调节、细胞代谢、应激反应等过程的调节; 39 个蛋白质属于细胞特有组成成分; 31 个蛋白质参与蛋白质结合, 14 个蛋白质参与细胞黏附、脂质结合、小分子结合和信号受体激活(图 4A)。

2.5.2 亚细胞定位

对差异蛋白质进行亚细胞定位, 发现有 22 个差异蛋白质位于细胞外, 其余分布在细胞核、细胞膜、线粒体、细胞质和内质网中(图 4B), 其中与免疫相关的 C4A、C8B、SERPINF2、A2M、SERPINC1、CTSB、SERPING1 等 7 个差异蛋白质均在细胞外。

2.5.3 KEGG 功能分类

对差异蛋白质 KEGG 功能分类, 可分为细胞进程、环境信息调控、遗传信息处理、人类疾病、代谢及生物系统几个部分, 其是最大一类属于生物系统, 其次是人类疾病(图 4C)。其中免疫系统差异最多的共有 8 个蛋

白质, 包括 C4A、C8B、SERPINF2、A2M、SERPINC1、CTSB、SERPING1、C5, 初步说明 MV-Hu191 对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用可能与激活肿瘤免疫有关。

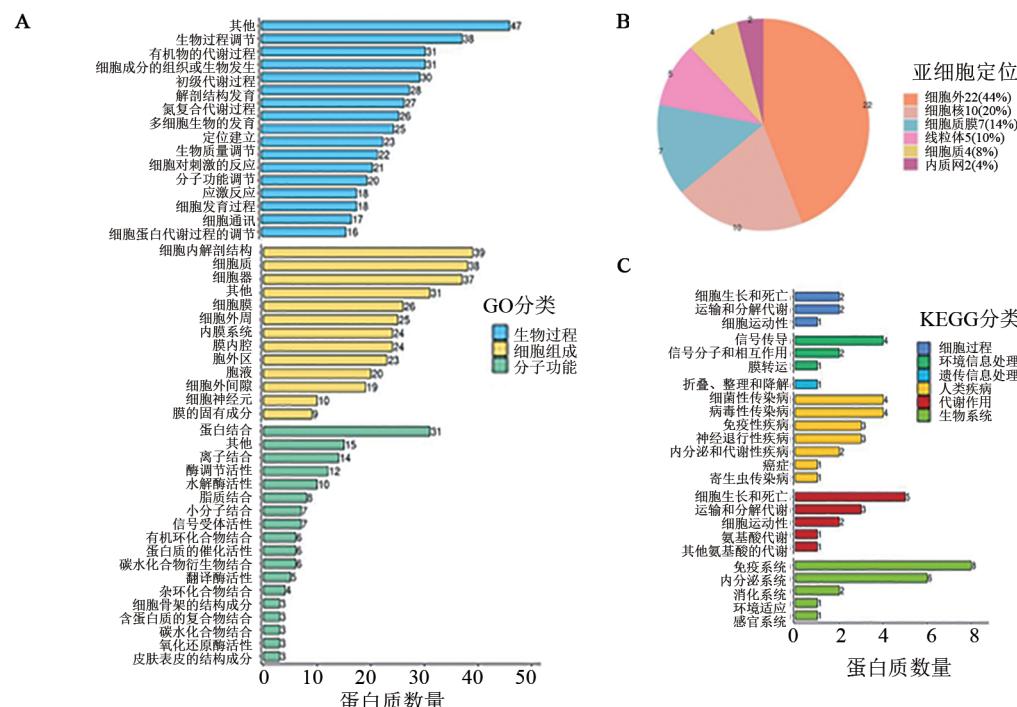
2.6 差异蛋白质功能富集分析

2.6.1 GO 富集

差异蛋白质参与补体激活的负调控作用、蛋白质激活级联调控、巨噬细胞迁移的负调控、巨噬细胞趋化性的负调控、急性炎症反应的调节、体液免疫反应的负向调节、急性期反应、蛋白质成熟的负调控作用、蛋白质加工调控、蛋白质成熟调控等生物进程(图 5A); 分子功能主要体现在结合 TNF、结合 IL-8、结合趋化因子、结合 C5L2 敏感性毒素趋化受体、结合 C5a 敏感性毒素趋化受体、结合 CXCL10 趋化因子, 调控丝氨酸型内肽酶抑制剂、调控信号受体、分子传感器等(图 5B)。其富集功能主要围绕免疫作用及蛋白质修饰。

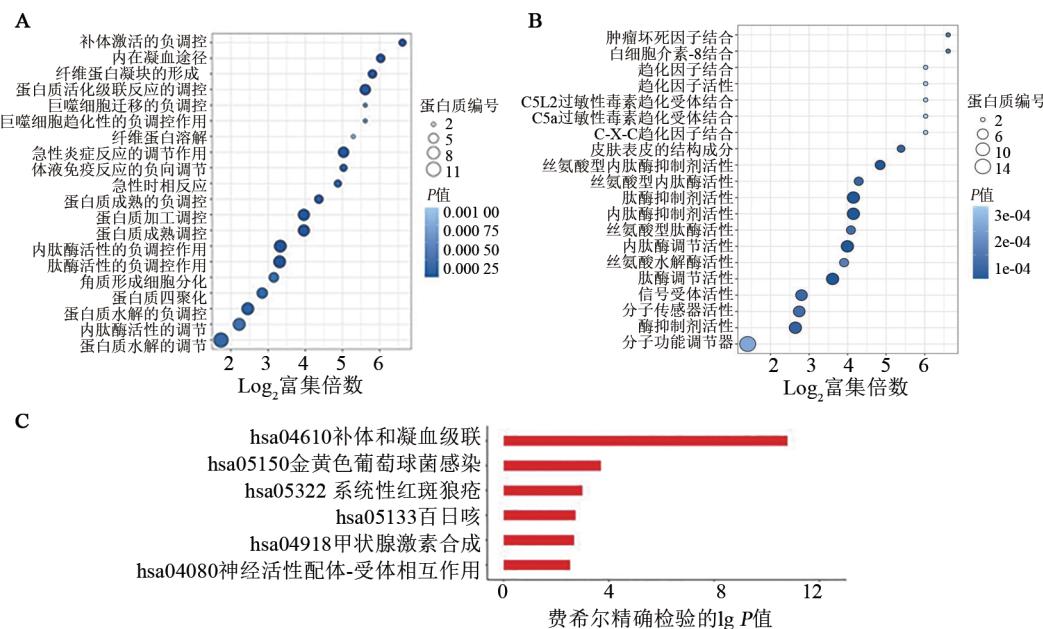
2.6.2 KEGG 通路富集

差异蛋白质集中于补体途径、金黄色葡萄球菌感染、系统性红斑狼疮、甲状腺激素的合成、神经活性配体-受体的相互作用等通路(图 5C)。



A: GO 功能分类; B: 亚细胞定位; C: KEGG 路径分类与分析。

图 4 MV-Hu191 处理后 MDA-MB-231 细胞中差异蛋白质功能分类



A: GO 富集生物过程; B: GO 富集分子功能; C: KEGG 功能富集。

图 5 MDA-MB-231 细胞蛋白质谱中差异蛋白质功能富集分析

2.7 免疫相关差异蛋白质与抗肿瘤免疫分子相互作用

已证实 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞是发挥抗肿瘤效应的免疫细胞, TNF-α 和 IL-6 作为抗肿瘤直接作用效应分子与乳腺癌发生、发展密切相关^[12-13]。将免疫相关差异蛋白质与抗肿瘤免疫分子进行蛋白质互作分析, 结果(图 6)表明两两相互关联, 初步证实 MV-Hu191 抗肿瘤作用可能与影响 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞功能和 TNF-α、IL-6 水平

有关。

2.8 MV-Hu191 抑制 4T1 细胞小鼠移植瘤的生长

与对照组相比, MV-Hu191 处理组肿瘤质量为 (0.783±0.154)g, 显著低于对照组肿瘤质量的 (1.861±0.536)g, 差异有统计学意义 ($P<0.01$, 图 7); 其虽较低于紫杉醇组的 (1.128±0.673)g, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果表明, MV-Hu191 具有抑制 4T1 细胞小鼠移植瘤生长的作用。

2.9 MV-Hu191 能明显增加荷瘤小鼠脾组织中 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞的比值

与对照组相比,MV-Hu191作用组荷瘤小鼠脾组织中的 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD8⁺ 和 CD4CD8⁻ T 淋巴细胞数量无显著差异($P>0.05$, 图 8A、B)。对照组 CD4⁺/CD8⁺ 比值为 5.994 ± 2.159 , 紫杉醇组 CD4⁺/CD8⁺ 比值为 6.294 ± 0.867 , MV-Hu191 组 CD4⁺/CD8⁺ 比值为 8.752 ± 0.956 , MV-Hu191 组的比值显著高于对照组($P<0.05$, 图 8A、C)。结果说明,MV-Hu191 能增加 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值, 促进机体 T 细胞抗肿瘤功能活化。

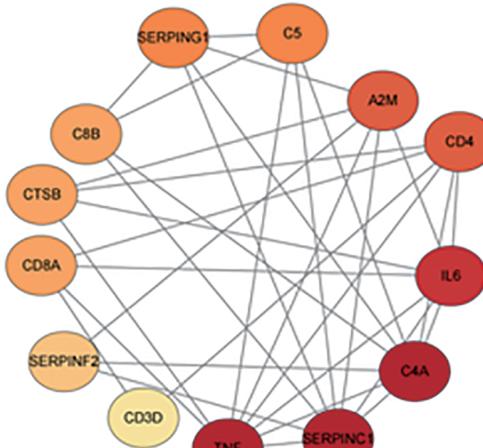
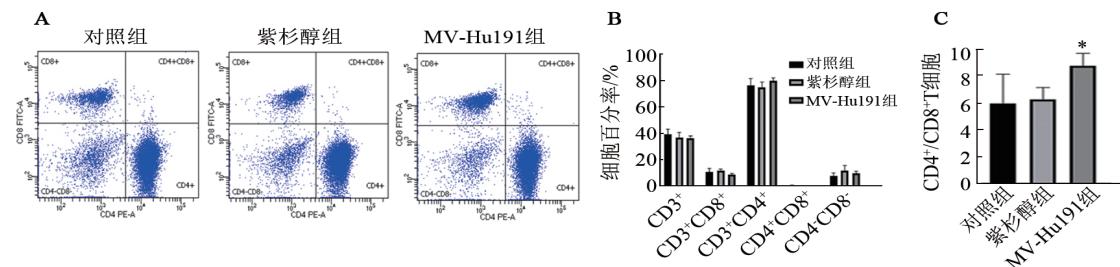


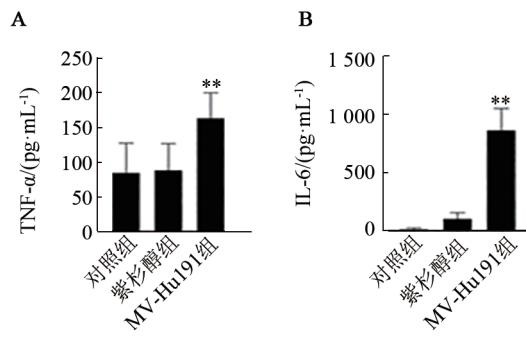
图 6 MDA-MB-231 细胞的免疫相关差异蛋白质与抗肿瘤分子蛋白质相互作用网络



与对照组相比, $*P<0.05$ 。

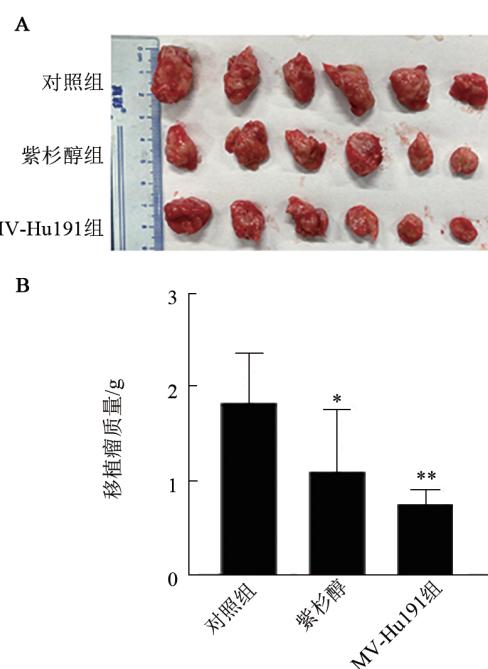
A: 各组荷瘤小鼠脾组织中 T 细胞亚群流式细胞术检测图; B: T 细胞亚群类型和数量百分率; C: CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值。

图 8 MV-Hu191 处理能增加 4T1 移植瘤小鼠脾组织中 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值



与对照组、紫杉醇组相比, $**P<0.01$ 。

图 9 MV-Hu191 处理能提高 4T1 细胞移植瘤小鼠血清 TNF-α(A)、IL-6(B) 水平



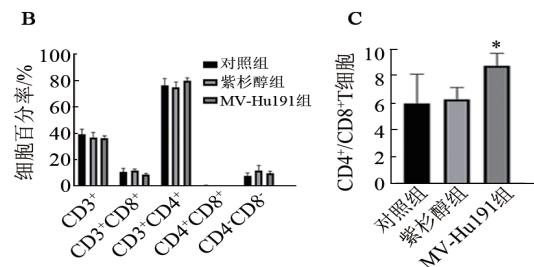
与对照组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

A: 4T1 细胞移植瘤组织; B: 移植瘤质量统计分析。

图 7 MV-Hu191 对 4T1 细胞移植瘤生长的影响

2.10 MV-Hu191 提高荷瘤小鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平

ELISA 法检测结果(图 9)显示,MV-Hu191 组的 TNF- α 含量显著高于对照组和紫杉醇组, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 其 IL-6 含量也显著高于对照组和紫杉醇组, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。



3 讨论

TNBC 作为常见的女性恶性肿瘤, 治疗手段主要采用手术为主, 辅助以化疗和放疗, 但放化疗均具有严重的毒性作用, 因此亟须一种高效、精确的靶向治疗手段。溶瘤病毒通过诱导免疫原性癌细胞死亡, 促使肿瘤相关抗原的局部扩散, 激活淋巴细胞发挥抗肿瘤作用^[14]。麻疹病毒特异性侵袭肿瘤细胞并诱导免疫应答发挥抗肿瘤的特性, 使其成为肿瘤治疗的一种新型治疗方法。本研究基于蛋白组学技术探讨 MV-Hu191 对 TNBC 细胞 MDA-MB-231 增殖的抑



制作用机制,体内外实验结果显示,MV-Hu191具有抑制MDA-MB-231、4T1细胞增殖的作用,并对4T1细胞小鼠皮下移植瘤具有明显的抑制作用。

为探讨MV-Hu191抑制TNBC细胞MDA-MB-231和4T1细胞增殖活性的机制,本研究采用蛋白质组学技术的质谱-色谱联用分析手段,对MV-Hu191处理后MDA-MB-231细胞蛋白质谱进行定量检测,以筛查病毒作用后细胞蛋白质谱的变化。对MV-Hu191干预MDA-MB-231细胞后出现的差异蛋白质进行功能分类及功能富集分析,结果表明差异蛋白质参与生物调节过程、细胞代谢过程、应激反应、细胞蛋白代谢过程的调节;参与细胞黏附、脂质结合、小分子结合、信号受体激活等分子功能;功能富集分析表明差异蛋白质主要以调节免疫功能为主。与本研究一致的是,VEINALDE等^[15]也证实表达人甲状腺碘化钠转运体蛋白的重组麻疹溶瘤病毒(MV-NIS)株干预胰腺导管腺癌模型小鼠后,基因表达谱的差异基因主要与免疫激活相关,如细胞因子分泌、趋化因子信号和T细胞受体信号增强等。体内实验研究发现,MV-Hu191干预4T1细胞移植瘤小鼠后,MV-Hu191处理组CD4⁺ T细胞数量增加,CD4⁺/CD8⁺ T细胞比值显著上升,血清细胞因子TNF-α和IL-6显著上调。IANKOV等^[16]曾报道基因工程设计重组病毒(MV-s-NAP)上调TNBC模型小鼠胸腔积液中TNF-α、IL-6和IL-12/23水平;IANKOV等^[17]单用MV疫苗株干预MDA-MB-231细胞异种移植模型小鼠后发现,肿瘤组织中CD4⁺、CD8⁺ T淋巴细胞浸润增加;也有研究^[18]证明,CD4⁺/CD8⁺ T细胞比值降低是乳腺癌患者临床预后不良标志之一;TODO等^[19]报道在溶瘤疱疹病毒g47治疗复发性胶质母细胞瘤II期临床试验中,溶瘤疱疹病毒g47增加患者血液CD4⁺/CD8⁺ T淋巴细胞比值。综合本研究结果与一系列报道,认为麻疹疫苗株对TNBC抑制作用主要通过刺激增强免疫效应而达到溶瘤效果。

目前麻疹疫苗株发挥免疫调节的机制尚未阐明。本研究结果发现MV-Hu191上调8个免疫相关蛋白质表达,蛋白质互作分析显示与CD3、CD4、CD8、TNF-α、IL-6蛋白质相互关联。KOZMA等^[20]研究证实C4A高度活化刺激IL-6和TNF-α水平升高;BAI等^[21]发现,高表达A2M促进CD4⁺、CD8⁺ T细胞在肺恶性肿瘤浸润;CTSB作为乳腺癌迁移和侵袭的标志物已被相关研究报道证实^[22-23];SEVENICH^[24]发现,过表达CTSB的乳腺癌小鼠肿瘤相关的B细胞和肥大细胞数量增加;IBRAHIM等^[25]对乳腺癌标志物研究显示CTSB的表达与IL-6成正相关。研究初步证实MV-Hu191可能通过上调C4A、A2M、CTSB免疫

相关蛋白质表达,促进抗肿瘤细胞及因子表达进而发挥抗肿瘤作用。然而,与其他免疫相关差异蛋白质的相关性未见报道,同时也是本研究尚存在不足之处,这将是后续探究的重点。

综上所述,MV-Hu191通过调控抗肿瘤免疫抑制MDA-MB-231和4T1细胞的增殖,这一研究为MV-Hu191作为TNBC潜在抗癌剂的探索提供了实验基础,也为TNBC治疗提供了新方向。

[参考文献]

- [1] 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] PEROU C M, SØRLIE T, EISEN M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2000, 406(6797): 747-752. DOI: 10.1038/35021093.
- [3] BRENTON J D, CAREY L A, AHMED A A, et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(29): 7350-7360. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.3845.
- [4] NAN J N, HU X G, GUO B B, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates triple-negative breast cancer cell viability, migration, and invasion by Syntenin/SOX4/Wnt/β-catenin pathway via regulation of heat shock protein A4[J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 10564-10577. DOI: 10.1080/21655979.2022.2062990.
- [5] CARTER M E, HARTKOPF A D, WAGNER A, et al. A three-dimensional organoid model of primary breast cancer to investigate the effects of oncolytic virotherapy[J/OL]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 826302[2023-05-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35223990/>. DOI: 10.3389/fmbo.2022.826302.
- [6] YANG B, SHI J W, SUN Z, et al. Attenuated measles virus overcomes radio-and chemoresistance in human breast cancer cells by inhibiting the non-homologous end joining pathway[J]. Oncol Rep, 2020, 44(5): 2253-2264. DOI: 10.3892/or.2020.7768.
- [7] 徐闻青,陈志慧.“沪191”麻疹减毒活疫苗为中国消除麻疹作出贡献[J].上海医药,2010,31(2): 59-61. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1533.2010.02.003.
- [8] WANG Y, LIU R, LU M, et al. Enhancement of safety and immunogenicity of the Chinese Hu191 measles virus vaccine by alteration of the S-adenosylmethionine (SAM) binding site in the large polymerase protein[J]. Virology, 2018, 518: 210-220. DOI: 10.1016/j.virol.2018.02.022.
- [9] LV Y, ZHANG C D, WANG Y L, et al. Synergism of rMV-Hu191 with cisplatin to treat gastric cancer by acid sphingomyelinase-mediated apoptosis requiring integrity of lipid raft microdomains[J]. Gastric Cancer, 2021, 24(6): 1293-1306. DOI: 10.1007/s10120-021-01210-8.
- [10] ZHANG C D, WANG Y L, ZHOU D M, et al. A recombinant Chinese measles virus vaccine strain rMV-Hu191 inhibits human colorectal cancer growth through inducing autophagy and apoptosis regulating by PI3K/AKT pathway[J/OL]. Transl Oncol, 2021, 14(7): 101091 [2023-05-02]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101091>. DOI: 10.1016/



- j.tranon.2021.101091.
- [11] ZHU M Y, WANG Y L, QU C F, et al. Recombinant Chinese Hu191 measles virus exhibits a significant antitumor activity against nephroblastoma mediated by immunogenic form of apoptosis[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(4): 2077-2093.
- [12] 戴毅君, 邱燕如, 江振健, 等. 三阴性乳腺癌组织中PD-L1和CD8⁺TIL的水平及其临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(9): 920-925. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.009.
- [13] BELCHER E K, CULAKOVA E, GILMORE N J, et al. Inflammation, attention, and processing speed in patients with breast cancer before and after chemotherapy[J]. J Natl Cancer Inst, 2022, 114(5): 712-721. DOI: 10.1093/jnci/djac022.
- [14] POL J G, WORKENHE S T, KONDA P, et al. Cytokines in oncolytic virotherapy[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2020, 56: 4-27. DOI: 10.1016/j.cytofr.2020.10.007.
- [15] VEINALDE R, PIDELASERRA-MARTÍ G, MOULIN C, et al. Virotherapy combined with anti-PD-1 transiently reshapes the tumor immune environment and induces anti-tumor immunity in a preclinical PDAC model[J/OL]. Front Immunol, 2023, 13: 1096162 [2023-05-02]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1096162>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1096162.
- [16] IANKOV I D, ALLEN C, FEDERSPIEL M J, et al. Expression of immunomodulatory neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* enhances the antitumor activity of oncolytic measles virus[J]. Mol Ther, 2012, 20(6): 1139-1147. DOI: 10.1038/mt.2012.4.
- [17] IANKOV I D, MSAOUEL P, ALLEN C, et al. Demonstration of anti-tumor activity of oncolytic measles virus strains in a malignant pleural effusion breast cancer model[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 122(3): 745-754. DOI: 10.1007/s10549-009-0602-z.
- [18] UDDIN M N, WANG X S. Identification of key tumor stroma-associated transcriptional signatures correlated with survival prognosis and tumor progression in breast cancer[J]. Breast Cancer, 2022, 29(3): 541-561. DOI: 10.1007/s12282-022-01332-6.
- [19] TODO T, ITO H, INO Y, et al. Intratumoral oncolytic herpes virus G47Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial[J]. Nat Med, 2022, 28(8): 1630-1639. DOI: 10.1038/s41591-022-01897-x.
- [20] KOZMA G T, MÉSZÁROS T, BAKOS T, et al. Mini-factor H modulates complement-dependent IL-6 and IL-10 release in an immune cell culture (PBMC) model: potential benefits against cytokine storm[J/OL]. Front Immunol, 2021, 12: 642860 [2023-05-02]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.642860>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.642860.
- [21] BAI Y Q, PEI Y, XIA L, et al. A novel immune-prognosis index predicts the benefit of lung adenocarcinoma patients[J/OL]. Front Pharmacol, 2022, 13: 818170 [2023-05-02]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.818170>. DOI: 10.3389/fphar.2022.818170.
- [22] LI X X, LIANG Y J, LIAN C, et al. CST6 protein and peptides inhibit breast cancer bone metastasis by suppressing CTSB activity and osteoclastogenesis[J]. Theranostics, 2021, 11(20): 9821-9832. DOI: 10.7150/thno.62187.
- [23] GOMEZ-AULI A, ELISABETH HILLEBRAND L, CHRISTEN D, et al. The secreted inhibitor of invasive cell growth CREG1 is negatively regulated by cathepsin proteases[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(2): 733-755. DOI: 10.1007/s00018-020-03528-5.
- [24] SEVENICH L, WERNER F, GAJDA M, et al. Transgenic expression of human cathepsin B promotes progression and metastasis of polyoma-middle-T-induced breast cancer in mice[J]. Oncogene, 2011, 30(1): 54-64. DOI: 10.1038/onc.2010.387.
- [25] IBRAHIM S A, EL-GHONAIMY E A, HASSAN H, et al. Hormonal-receptor positive breast cancer: IL-6 augments invasion and lymph node metastasis via stimulating cathepsin B expression[J]. J Adv Res, 2016, 7(5): 61-70. DOI: 10.1016/j.jare.2016.06.007.

[收稿日期] 2023-02-13

[修回日期] 2023-05-15

[本文编辑] 黄静怡,沈志超