

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.02.003

干扰素刺激基因家族成员黏病毒抵抗蛋白2限制肿瘤细胞对呼肠孤病毒溶瘤敏感性的实验研究

梁丹^{1,2}, 杨再玲^{1,2}, 余佳霓^{1,2}, 李欣兰^{2,3}, 沈涛^{1,2}, 孙永顺^{2,4}, 韦永竹^{2,4}, 赵星^{1,2} (1. 贵州医科大学基础医学院 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550000; 2. 贵州医科大学 组织工程与干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550000; 3. 贵州医科大学 基础医学院 生物学教研室, 贵州 贵阳 550000; 4. 贵州医科大学 基础医学院 肿瘤免疫治疗实验室, 贵州 贵阳 550000)

[摘要] **目的:** 探讨干扰素刺激基因家族成员黏病毒抵抗蛋白2(MX2)在调控肿瘤细胞对呼肠孤病毒(Reo)溶瘤敏感性中的作用及其机制。**方法:** 选取4株具有不同耐药特征的人源肿瘤细胞, 通过CCK-8法评估其对Reo的溶瘤敏感性; 通过转录组测序筛选出差异表达基因MX2, qPCR法及WB法验证MX2在4株人源肿瘤细胞中的表达; 使用siRNA敲低溶瘤低敏感性的COC1/DDP细胞中的MX2基因。在细胞感染Reo病毒后, 通过CCK-8法检测细胞存活率; qPCR法检测细胞中Reo病毒S1基因表达; 免疫荧光法检测细胞内Reo病毒蛋白的积累; 半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)法测定病毒滴度; 流式细胞术分别检测细胞内Reo病毒dsRNA、活性氧(ROS)水平以及细胞凋亡率; 透射电镜观察细胞内质网形态变化并采用WB法检测内质网应激相关蛋白(JNK、p-JNK、eIF2 α 、p-eIF2 α 、CHOP、PERK)的表达。**结果:** 在4株肿瘤细胞中, SKOV3细胞对Reo溶瘤作用高度敏感, 而COC1/DDP、HuH-7^{SRB}及SNU-398细胞均为溶瘤低敏感性。转录组测序结果显示, MX2在溶瘤低敏感肿瘤细胞中的表达水平显著高于溶瘤高敏感细胞($P < 0.01$); 在溶瘤低敏感性的COC1/DDP细胞中, 敲低MX2显著促进Reo病毒复制、诱导细胞凋亡增加, 并升高细胞内活性氧水平(均 $P < 0.001$)。透射电镜观察显示, 敲低MX2的COC1/DDP细胞感染Reo病毒后出现内质网肿胀、扩张及断裂等典型内质网应激超微结构改变。WB结果显示, 内质网应激关键标志物eIF2 α /p-eIF2 α 、PERK、CHOP及凋亡相关调节蛋白JNK/p-JNK的表达均显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** 肿瘤细胞对Reo的溶瘤敏感性与其细胞内MX2表达水平密切相关。敲低MX2可显著增强Reo在细胞内的复制, 进而促进ROS积累, 触发内质网应激并促进凋亡。病毒复制增加与细胞凋亡激活的双重作用, 最终协同增强Reo的溶瘤作用。

[关键词] 呼肠孤病毒; 黏病毒抵抗蛋白2; 病毒复制; 活性氧; 内质网应激; 凋亡; 溶瘤效应

[中图分类号] R73-3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026)02-0132-08

Experimental study on interferon-stimulated gene myxovirus resistance protein 2-mediated restriction of tumor cell sensitivity to reovirus oncolysis

LIANG Dan^{1,2}, YANG Zailing^{1,2}, YU Jian^{1,2}, LI Xinlan^{2,3}, SHEN Tao^{1,2}, SUN Yongshun^{2,4}, WEI Yongzhu^{2,4}, ZHAO Xing^{1,2} (1. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou, China; 2. Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou, China; 3. Department of Biology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou, China; 4. Tumor Immunology Laboratory, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role and underlying mechanism of myxovirus resistance protein 2 (MX2), a member of the interferon-stimulated gene family, in modulating tumor cell sensitivity to reovirus (Reo)-mediated oncolysis. **Methods:** Four human tumor cell lines with distinct drug-resistance characteristics were selected, and their sensitivity to Reo-mediated oncolysis was evaluated using the CCK-8 assay. Transcriptome sequencing was performed to identify differentially expressed genes, and MX2 was screened as a candidate gene. The differential expression of MX2 was validated by qPCR and WB assay. In the Reo-low-sensitive COC1/DDP cells, MX2 was knocked down using siRNA, followed by Reo infection, and cell viability was assessed using CCK-8 assay. Viral replication was evaluated by measuring S1 gene expression using qPCR, intracellular viral protein accumulation by

[基金项目] 国家自然科学基金(82460604); 贵州省科技计划支撑项目资助[黔科合支撑(2025)一般126号]; 贵州医科大学肿瘤免疫治疗工程研究中心项目(校工程中心, 第2024[001]号)

[作者简介] 梁丹, 硕士生

[通信作者] 赵星(扫码获取作者通信方式)



immunofluorescence staining, and viral titer by the TCID₅₀ assay. Intracellular Reo dsRNA levels, reactive oxygen species (ROS) production, and apoptosis rates were measured using flow cytometry. Ultrastructural changes in the endoplasmic reticulum (ER) were examined using transmission electron microscopy (TEM). Additionally, WB was used to assess the expression of ER stress-related proteins, including JNK, p-JNK, eIF2 α , p-eIF2 α , CHOP, and PERK. **Results:** Among the four tested tumor cell lines, SKOV3 cells exhibited high sensitivity to Reo-mediated oncolysis, whereas COC1/DDP, HuH-7^{SRB}, and SNU-398 cells showed low sensitivity. Transcriptome sequencing revealed that MX2 expression was significantly higher in Reo-low-sensitive cell lines compared with Reo-high-sensitive cells ($P < 0.01$). In COC1/DDP cells, MX2 knockdown markedly enhanced Reo replication, increased apoptosis, and elevated intracellular ROS levels (all $P < 0.001$). TEM revealed typical ultrastructural features of ER stress in MX2-knockdown COC1/DDP cells following Reo infection, including ER swelling, dilation, and fragmentation. WB analysis showed significant upregulation of key ER stress markers (p-eIF2 α /eIF2 α , PERK, and CHOP) and apoptosis-related regulatory proteins JNK/ p-JNK ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Tumor cell sensitivity to Reo-mediated oncolysis is closely associated with intracellular MX2 expression levels. Knockdown of MX2 significantly enhanced intracellular Reo replication, leading to ROS accumulation, activation of ER stress, and induction of apoptosis. The synergistic effects of enhanced viral replication and apoptosis ultimately potentiate the oncolytic efficacy of Reo.

[Key words] reovirus (Reo); myxovirus resistance protein 2 (MX2); viral replication; reactive oxygen species (ROS); endoplasmic reticulum stress; apoptosis; oncolytic effect

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(2): 132-139. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.02.003]

溶瘤病毒作为能选择性溶破肿瘤细胞并激活抗肿瘤免疫的新兴疗法,为肿瘤治疗带来新希望^[1]。呼肠孤病毒(reovirus, Reo)因其良好的安全性和显著的溶瘤活性,已成为溶瘤病毒治疗领域的研究热点之一。目前,基于Reo病毒开发的临床候选药物REOLYSIN[®]已在包括卵巢癌在内的多种实体瘤中开展了30余项临床试验。然而,Reo联合紫杉醇治疗复发性卵巢癌的II期临床试验^[2]显示,联合治疗组未能显著改善患者的无进展生存期和总生存期。有研究^[3-5]发现,Reo在部分患者的肿瘤组织中复制受限,提示肿瘤细胞对Reo的低敏感性可能是限制其溶瘤疗效的关键因素。Reo的溶瘤作用不仅源于对肿瘤细胞的直接裂解,更与其诱导的细胞应激反应密切相关^[6]。溶瘤病毒在肿瘤细胞内大量复制可诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累,进而诱发内质网应激,协同激活内源性凋亡通路,从而增强其溶瘤效应^[7]。因此,促进Reo在肿瘤细胞内的复制是增强其溶瘤效应的关键。干扰素刺激基因(interferon-stimulated gene, ISG)是宿主抗病毒防御的核心组成部分。研究^[8]表明,肿瘤细胞可通过组成型高表达特定ISG,获得对溶瘤病毒的固有抵抗,从而表现出溶瘤低敏感性。例如,黏病毒抵抗蛋白A(myxovirus resistance protein A, MxA)等ISG的高表达与胰腺癌细胞对水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)的低敏感性相关^[9];在吉西他滨耐药及VSV溶瘤不敏感的肿瘤细胞中,亦观察到多个ISG的显著上调^[10]。黏病毒抵抗蛋白2(myxovirus resistance protein 2, MX2)作为ISG家族的重要成员,已被证实可抑制腺病毒、单纯疱疹病毒及VSV等多种溶瘤病毒在肿瘤细胞内的复制^[11-13]。然而,MX2在调控Reo

复制及其溶瘤效应中的作用尚不清楚。值得注意的是,对化疗或靶向治疗药物耐药的肿瘤细胞常伴随干扰素通路持续活化及ISG组成型高表达,从而对溶瘤病毒产生交叉抵抗性^[14]。因此,本研究以具有不同耐药特征的人卵巢癌顺铂耐药细胞COC1/DDP、人原发性肝癌耐药细胞SNU-398及肝癌索拉非尼耐药细胞HuH-7^{SRB}作为模型,探究耐药肿瘤细胞中ISG成员MX2是否介导其对Reo的低敏感性。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人卵巢癌细胞SKOV3购自武汉普诺赛生命科技有限公司,人卵巢癌顺铂耐药细胞COC1/DDP由贵州省人民医院訾聘教授惠赠,人原发性肝癌耐药细胞SNU-398购自广州三询生物科技有限公司,索拉非尼耐药肝癌细胞HuH-7^{SRB}由贵州医科大学张深杰博士构建并惠赠,L929细胞(小鼠成纤维细胞)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,呼肠孤病毒T3D株由本课题组扩增纯化后保存于液氮中。干扰小RNA(small interfering RNA, siRNA)由上海吉玛制药技术有限公司合成,siRNA转染试剂盒亦购自该公司,siRNA-MX2-1正义链序列为5'-GCCAACGAGA UCCCAUUUAUTT-3',反义链序列为5'-UAAAUUGGAUCUGGUUGCTT-3',siRNA-MX2-2正义链序列为5'-GACCGGUUAUAC ACAAATT-3',反义链序列为5'-UUGUGUAUAAAC GGGUCTT-3',siRNA-MX2-3正义链序列为5'-CCG CUACCAAGAGAAGAUUTT-3',反义链序列为5'-AUU CUCCUCUGGAAGCGTT-3',阴性对照siRNA正义链序列为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反义链序列为5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3',qPCR

试剂盒购自 TaKaRa 公司, ROS 检测试剂盒与 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒均购自南京凯基生物科技有限公司, 胎牛血清、DMEM、McCoy's 5A 及 RPMI 1640 培养基均购自美国 Gibco 公司, SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、增强型 RIPA 裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、双色预染蛋白 Marker 及通用型抗体稀释液均购自武汉赛维尔生物科技有限公司, 流式细胞术所用鼠源抗双链 RNA (dsRNA) 单克隆抗体 J2 购自荷兰 Nordic Mubio 公司 (稀释比 1:500) 及 Alexa Fluor 488 标记的二抗购自英国 Abcam 公司 (稀释比 1:1 000), 其余所用一抗与二抗均购自杭州华安生物技术有限公司, 具体包括: MX2 抗体 (HA721234, 稀释比 1:1 000)、c-Jun N-末端激酶 (JNK) 抗体 (HA720189, 稀释比 1:1 000)、p-JNK (Thr183/Tyr185) 抗体 (HA721567, 稀释比 1:500)、真核翻译起始因子 2 α 亚基 (eIF2 α) 抗体 (HA720345, 稀释比 1:1 000)、p-eIF2 α (Ser51) 抗体 (HA721678, 稀释比 1:1 000)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 抗体 (HA720456, 稀释比 1:500)、PKR 样内质网激酶 (protein kinase RNA-like ER kinase, PERK) 抗体 (HA720567, 稀释比 1:1 000)、GAPDH 抗体 (HA701234, 稀释比 1:5 000)、 β -Tubulin (β -微管蛋白) 抗体 (HA701567, 稀释比 1:5 000) 以及 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (HA1001, 稀释比 1:5 000)。

1.2 细胞培养与 siRNA 转染

SKOV3 细胞用 McCoy's 5A 培养基、COC1/DDP 细胞用 RPMI 1640 培养基培养, SNU-398 与 HuH-7^{SRB} 细胞则使用 DMEM 培养基培养。所有细胞均置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。待细胞汇合度达 70%~80% 时, 按照 siRNA 转染试剂盒说明书操作, 分别将 siRNA-MX2-1、siRNA-MX2-2、siRNA-MX2-3 和阴性对照 siRNA (终浓度 50 nmol/L) 转染至 COC1/DDP 细胞, 分别记为 siMX2-1 组、siMX2-2 组、siMX2-3 组以及 siNC 组。细胞转染 24 h 后进行后续实验。

1.3 CCK-8 法检测肿瘤细胞感染 Reo 后的细胞存活率

取处于对数生长期的 SKOV3、COC1/DDP、SNU-398、HuH-7^{SRB} 细胞, 以 2×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板。待细胞贴壁后, 加入 T3D 病毒株, 分别以 0、1、5 的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 感染细胞。感染 48 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 于细胞培养箱内作用 2 h。随后, 使用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的光密度 (D) 值。细胞存活率计算公式为细胞存活率 = (实验组 D 值 - 空白孔 D 值) / (未感染病毒对照组 D 值 - 空白孔 D 值) \times 100%。其中, 空白孔为仅含培养基、无细胞的平行孔。

1.4 转录组测序比较 Reo 溶瘤敏感性差异肿瘤细胞

的基因表达特征

收集处于对数生长期的溶瘤高敏感 SKOV3 细胞和溶瘤低敏感 COC1/DDP 细胞。TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 操作全程严格防止 RNase 污染。RNA 样本经干冰速冻后送至上海美吉生物技术有限公司进行测序。测序在 Illumina NovaSeq 6000 平台上进行, 生成 150 bp 双端 reads (测序读段)。原始数据经质控后, 使用 HISAT2 比对至人类参考基因组 (GRCh38), HTSeq 计算基因 reads 计数。每千碱基百万片段数 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM) 值用于评估基因表达水平。使用 R (v4.3.0) 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 评估样本重复性; 采用 DESeq2 包进行差异表达分析, 筛选标准为 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且校正后 P 值 (FDR) < 0.05 。对差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 进行层次聚类, 并基于超几何检验进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析。

1.5 qPCR 法检测肿瘤细胞中 MX2 及 Reo 相关基因表达

按照 TRIzol 试剂说明书提取各组细胞总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qPCR, MX2 上游引物序列为 5'-GCTGCTGCTGCTGCTGCTG-3', 下游引物序列为 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGC-3'; Reo S1 基因上游引物: 5'-ATG GTGGTGGTGGTGGTGG-3', 下游引物序列为 5'-CCA CCCACCCACCCACCCA-3'; 内参基因 GAPDH 上游引物序列为 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 下游引物序列为 5'-GAAGATGGTGGTGGGATTTC-3'。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

1.6 WB 法检测 MX2 及内质网应激相关蛋白的表达

含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品加入 SDS 上样缓冲液, 95 °C 变性 5 min。SDS-PAGE 分离蛋白, 随后将蛋白转印至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。加入兔抗人 MX2 抗体检测 MX2 蛋白, GAPDH 为内参; 加入 JNK、p-JNK (Thr183/Tyr185)、eIF2 α 、p-eIF2 α (Ser51)、CHOP、PERK 抗体检测内质网应激相关蛋白, 并以 GAPDH 和 β -Tubulin 作为内参, 孵育过夜。TBST 洗涤后加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, ECL 化学发光试剂盒显影, Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以目的蛋白与 GAPDH 或 β -Tubulin 灰度值的比值表示蛋白相对表达量。

1.7 流式细胞术检测细胞内病毒 dsRNA、ROS 及细胞凋亡率

将处于对数生长期的 COC1/DDP 细胞接种在 6 孔板中,转染 siRNA。转染 24 h 后,以 Reo 感染细胞 (MOI=5),24 h 后将细胞固定透化,使用鼠源抗双链 RNA(dsRNA)单克隆抗体 J2 及 Alexa Fluor 488 标记的二抗进行染色,流式细胞仪检测 dsRNA 水平,以评估细胞内 Reo 病毒复制;细胞与 DCFH-DA 探针(用于检测和定量细胞内总 ROS 水平的荧光探针)避光结合后直接上机,通过检测荧光强度测定细胞内 ROS 水平;采用 Annexin V-FITC/PI 双染法将细胞用 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)染色,室温避光结合 15 min 后上机分析,区分活细胞、早期凋亡、晚期凋亡及坏死细胞。所有实验的流式数据均使用 FlowJo 软件进行分析,每个样本采集不少于 1×10^4 个细胞,并设置至少 3 个独立的生物学重复。

1.8 TCID₅₀法测定 Reo 病毒滴度

将 siNC 组和 siMX2 组细胞,在转染 24 h 后感染 Reo (MOI = 5),分别记为 siNC + Reo 组和 siMX2 + Reo 组。感染 48 h 后收集细胞培养上清液。将上清液按照 10^{-2} ~ 10^{-10} (稀释度)梯度稀释,接种于已铺有 L929 细胞(每孔 8×10^3 个)的 96 孔板中,每个稀释度设 6 个复孔。细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养 7 天。从接种病毒后第 1 天起,每日在显微镜下观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),对 CPE 程度进行半定量评分,“+”表示轻微病变,“++”表示中度病变,“+++”表示明显病变,“++++”表示严重病变,将 CPE 评分达到“++”及以上的孔定义为阳性孔。连续 7 d 观察并记录各稀释度中出现 CPE 的孔数。弃去培养基,PBS 轻柔洗涤 1 次;加入 4% 多聚甲醛,室温固定 30 min;PBS 洗涤 2 次;加入 0.1% 结晶紫染色液^[15],室温染色 20 min;弃染液,用去离子水缓慢冲洗至流下液体澄清,室温晾干,拍照保存。采用 Reed-Muench 法计算病毒滴度,结果以 log₁₀(TCID₅₀/mL)表示。

1.9 共聚焦显微镜观察肿瘤细胞内 Reo 及 ROS 含量

将 COC1/DDP 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于共聚焦培养皿,待细胞汇合度达 60%~70% 时,分别转染 siNC 或 siMX2。转染 24 h 后弃去培养基,PBS 洗涤,加入已标记 Alexa Fluor 647 的 Reo (MOI = 5),Reo 于 37 °C 吸附 2 h 后更换为含 2% FBS 的培养基继续培养。感染 24 h 后,弃去培养基,加入含 10 μmol/L DCFH-DA 的无血清培养基,37 °C 避光培养 30 min。PBS 洗涤后,加入 1 μg/mL Hoechst 33342 染料作用 10 min,标记细胞核。PBS 再次洗涤后,加入抗荧光淬灭剂。样品在激光扫描共聚焦显微镜下采集图像,并通过 Image J 软件分析各通道的平均荧光强度。

1.10 统计学处理

本研究所有实验数据均采用 SPSS 25.0 进行分析,所有实验均独立重复至少 3 次($n \geq 3$)。计量资料首先进行正态性检验与方差齐性检验。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异比较依据实验设计选择相应统计方法:两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P < 0.001$ 表示差异高度显著。

2 结果

2.1 MX2 在 Reo 溶瘤低敏感性肿瘤细胞中显著高表达

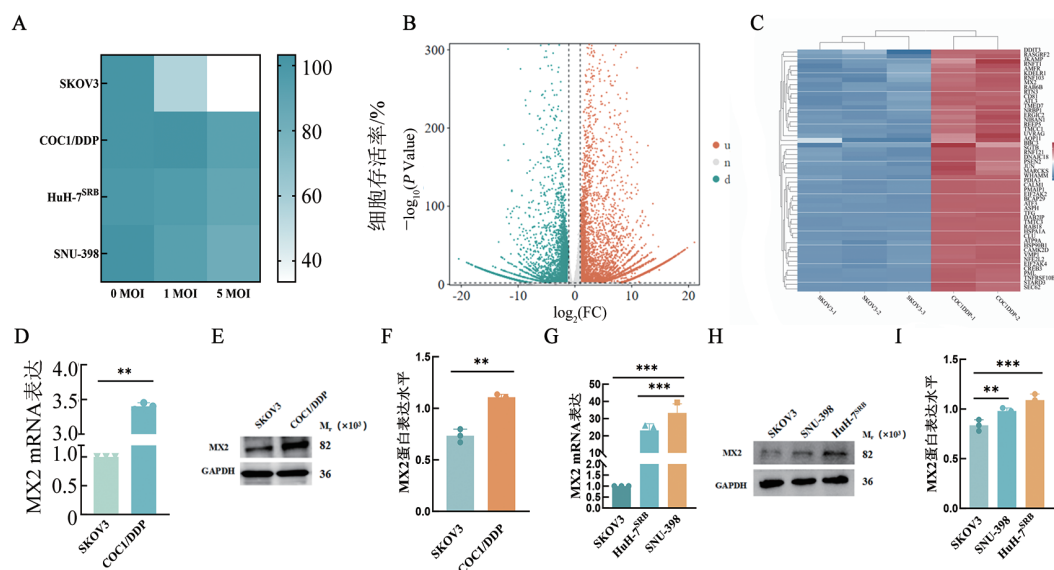
参考 SCHÄFER 等的研究^[16-17],将 Reo 感染后细胞存活率 $\leq 50\%$ 定义为溶瘤高敏感性,存活率 $\geq 80\%$ 定义为溶瘤低敏感性。CCK-8 法检测 Reo 感染后肿瘤细胞存活率^[16-17]。在 Reo 感染 48 h (MOI = 5) 后,SKOV3 细胞存活率为 $(33.92 \pm 0.83)\%$,表现为 Reo 高敏感性;而 COC1/DDP 细胞存活率为 $(92.83 \pm 3.29)\%$ 、HuH-7^{SRB} 细胞存活率为 $(86.34 \pm 3.06)\%$ 及 SNU-398 细胞存活率为 $(83.21 \pm 2.00)\%$,均表现为对 Reo 低敏感性(图 1A)。本研究选取表型对比最显著的 SKOV3 细胞(溶瘤高敏感)与 COC1/DDP(溶瘤低敏感)卵巢癌细胞进行转录组测序。差异表达分析结果(图 1B、C)结合文献调研提示,ISGs 家族成员 MX2 可能与肿瘤细胞对 Reo 溶瘤敏感性有关^[11]。为验证该发现,本研究进一步在三种低敏感细胞(COC1/DDP、HuH-7^{SRB} 及 SNU-398)中检测 MX2 的表达水平。qPCR 和 WB 结果一致显示(图 1D~I),相较于 SKOV3 细胞,上述低敏感细胞中 MX2 的 mRNA 和蛋白表达均显著上调($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。

2.2 敲低 MX2 显著增强 Reo 在 COC1/DDP 细胞中的复制并诱导细胞死亡

采用 siRNA 在 COC1/DDP 细胞中敲低 MX2 的表达,qPCR 与 WB 结果(图 2A~C)显示,与 siNC 组相比,siMX2-1 组、siMX2-2 组和 siMX2-3 组细胞的 MX2 mRNA 及蛋白水平均显著下降($P < 0.01$),其中以 siMX2-2 组细胞的 MX2 敲低效率最高,故后续实验均选用该组细胞。CCK-8 实验结果(图 2D)显示,相较于 siNC + Reo 组,siMX2 + Reo 组细胞存活率显著下降($P < 0.001$),提示 MX2 下调可有效增强 Reo 的溶瘤效应。鉴于 Reo 的抗肿瘤作用主要依赖于其在肿瘤细胞内的大量复制,引发细胞裂解及免疫激活^[18]。病毒复制可通过多重机制促进凋亡,包括:病毒 dsRNA 及蛋白通过 TLR3/RIG-I 通路激活外源性凋亡^[19],以及大量病毒复制所致线粒体功能障碍与内质网应激引发 ROS 爆发,进而触发内源性

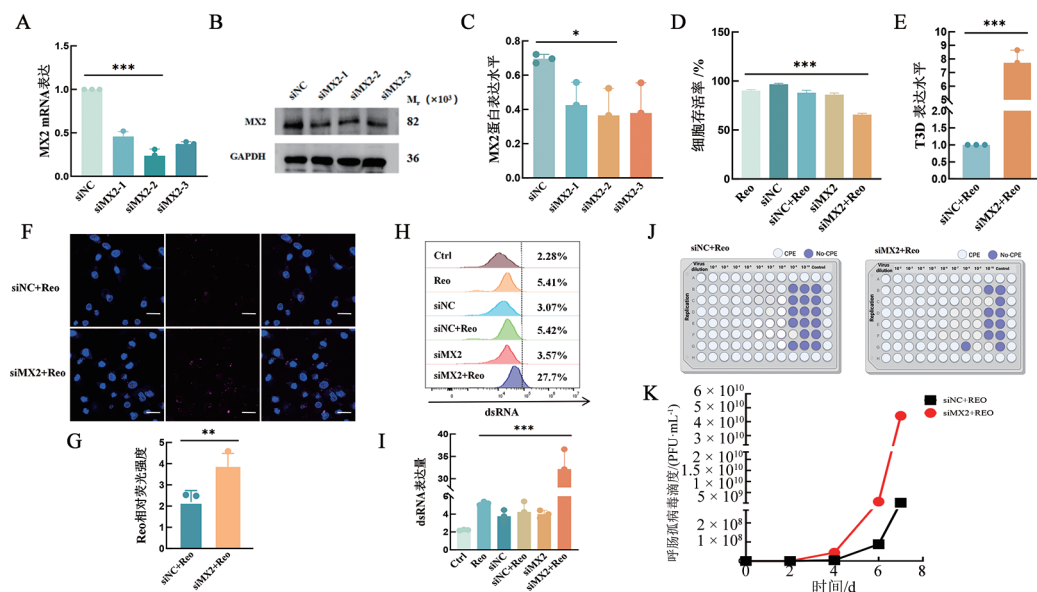
凋亡通路^[20]。因此本研究进一步评估了MX2敲低对Reo复制的影响,qPCR结果(图2E)显示,siMX2 + Reo组S1节段RNA水平较对照组显著增高($P < 0.001$);免疫荧光染色结果(图2F、G)显示,病毒蛋白荧光信号明显增强($P < 0.01$);流式细胞术检测胞内病毒dsRNA含量亦

显著升高(图2H、I, $P < 0.001$);TCID₅₀测定进一步证实,siMX2 + Reo组病毒滴度达 $10^{9.6}$ TCID₅₀/mL,显著高于对照组 $10^{7.6}$ TCID₅₀/mL(图2J、K)。因此,MX2敲低可显著增强Reo在溶瘤低敏感性卵巢癌细胞COC1/DDP中的复制效率与病毒蛋白合成。



A: CCK-8法检测SKOV3、COC1/DDP、HuH-7^{SRB}、SNU-398细胞对Reo的溶瘤敏感性;B:火山图显示SKOV3及COC1/DDP细胞间差异表达的基因;C:SKOV3及COC1/DDP细胞基因表达热图;D~F:qPCR(D)与WB(E、F)分别检测SKOV3与COC1/DDP细胞中MX2的mRNA转录水平及蛋白表达差异;G~I:qPCR(G)与WB(H、I)验证SKOV3、SNU-398与HuH-7^{SRB}细胞MX2的mRNA转录水平及蛋白表达差异。 $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

图1 不同肿瘤细胞对Reo的溶瘤敏感性及MX2的表达差异



A~C:qPCR(A)与WB(B、C)验证不同siRNA对COC1/DDP细胞中MX2的敲低效率;D:CCK-8法检测敲低MX2后感染Reo的COC1/DDP细胞存活率;E:qPCR检测细胞内Reo RNA水平;F、G:免疫荧光检测COC1/DDP细胞内Reo病毒蛋白(F, $\times 100$)及蛋白荧光强度统计分析(G);H、I:流式细胞术检测细胞内病毒dsRNA含量(H)及荧光强度统计分析(I);J、K:TCID₅₀法检测病毒滴度。

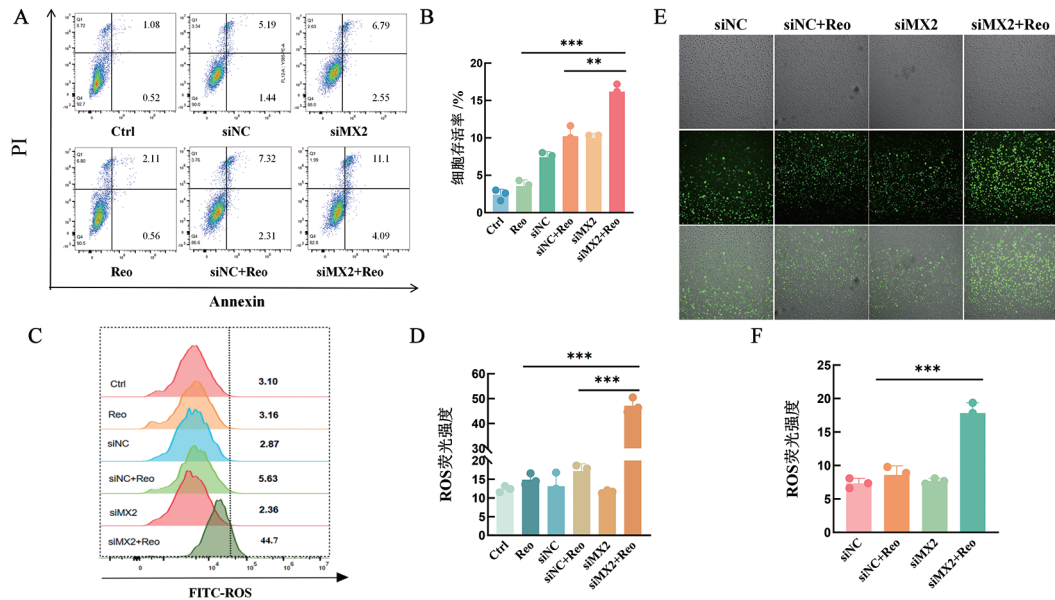
图2 敲低MX2对COC1/DDP细胞中Reo复制及细胞存活率的影响

2.3 敲低MX2协同Reo感染诱导COC1/DDP细胞凋亡及ROS积累

为探究MX2敲低联合Reo感染显著降低COC1/DDP细胞存活率的机制,本研究首先检测了细胞的

凋亡水平。流式细胞术结果(图 3A、B)显示, siMX2 + Reo 组的凋亡率较对照组显著升高($P < 0.01$)。已有研究^[21]表明, 溶瘤病毒在肿瘤细胞内大量复制可导致线粒体功能障碍, 引发 ROS 剧烈积累, 并进一步触发内质网应激。基于此, 采用 DCFH-DA 探针结合流式

细胞术与免疫荧光成像检测胞内 ROS 水平。结果(图 3C~F)显示, siMX2 + Reo 组的 ROS 荧光强度显著高于对照组($P < 0.001$)。综上, 敲低 MX2 不仅增强 Reo 介导的细胞凋亡, 还驱动 ROS 爆发, 为后续内质网应激通路的激活提供了关键上游信号。



A、B: 流式细胞术检测敲低 MX2 协同 Reo 感染对 COC1/DDP 细胞凋亡的影响(A)及其统计分析(B);
C、D: 流式细胞术检测敲低 MX2 协同 Reo 感染对 COC1/DDP 细胞内 ROS 水平的影响(C)及其统计分析(D);
E、F: 免疫荧光检测敲低 MX2 协同 Reo 感染对细胞内 ROS 水平的影响(E)及其统计分析(F, $\times 20$);
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图3 敲低 MX2 协同 Reo 感染对 COC1/DDP 细胞凋亡和 ROS 水平的影响

2.4 敲低 MX2 协同 Reo 感染激活 COC1/DDP 细胞内质网应激通路

鉴于 ROS 是诱导内质网应激的关键上游信号^[22], 本研究进一步探究敲低 MX2 联合 Reo 感染所引发的 ROS 爆发是否触发了内质网应激。GO 功能富集分析结果(图 4A)显示, 内质网应激反应通路显著富集, 具有较高的富集因子和较大的 $-\log_{10}(P \text{ value})$ (气泡颜色偏红), 提示该通路是差异表达基因参与的核心生物学过程之一。透射电镜观察结果(图 4B)显示, siNC + Reo 组细胞内质网呈典型的连续网状结构, 而 siMX2 + Reo 组则出现明显的病理改变, 包括内质网肿胀、膜结构断裂及大量扩张的囊泡形成, 符合内质网应激的超微结构特征。WB 结果(图 4C、D)显示, 与对照组相比, siMX2 + Reo 组中内质网应激关键效应分子, 包括 PERK、磷酸化 eIF2 α (p-eIF2 α)、促凋亡转录因子 CHOP, 以及应激相关激酶 JNK 及其磷酸化形式(p-JNK), 均显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

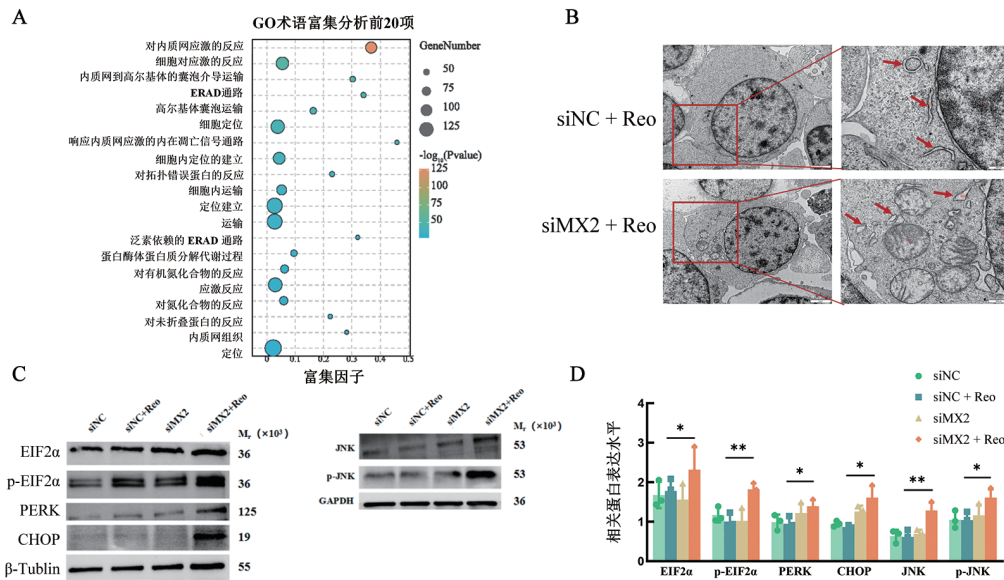
3 讨论

溶瘤病毒疗法在肿瘤治疗中展现出潜力, 但其疗效存在显著异质性^[23]。除病毒自身特性外, 宿主 ISG 的基础表达水平被认为是决定细胞抗病毒状态的关键因素之一^[24]。MX2 作为 ISG 家族中重要的抗病毒效应蛋白, 在人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒等病毒感染中作用明确^[25-26], 但其是否参与调控肿瘤细胞—尤其是耐药肿瘤细胞—对 Reo 的敏感性, 目前尚不清楚。因此, 亟待阐明 MX2 在介导溶瘤效应中的具体机制, 以发掘新的增敏靶点。

本研究证实, 在顺铂耐药卵巢癌细胞株 COC1/DDP 中, MX2 是限制 Reo 溶瘤效应的关键宿主因子。敲低 MX2 可显著增强 Reo 在细胞内的复制能力, 表现为病毒基因转录水平、胞内 dsRNA 及病毒滴度的同步升高, 从而有效提升 Reo 对 COC1/DDP 细胞的溶瘤效应。这一结果与 MX2 作为 ISG 抑制多种病毒复制的功能一致^[27-28], 并进一步拓展了其在 Reo 溶瘤过程中的负调控作用。此外, 本研究揭示了一条由 MX2 介导的级联通路, 即 MX2 下调可通过增强病毒复制, 诱导细胞内 ROS 大量积累, 触发内质网应激, 最终协同促进肿瘤细胞凋亡。已有研究^[29-30]表明,

Reo 及其他溶瘤病毒可通过诱导 ROS 积累和内质网应激促进凋亡, 而本研究进一步表明, MX2 高表达可

削弱这一过程, 为化疗耐药肿瘤对溶瘤病毒的交叉抵抗提供了新机制解释。



A:GO 富集分析筛选显著富集的生物学功能;B:透射电子显微镜观察细胞内质网的结构(× 30 000);C、D:WB 检测内质网应激反应通路多种标志蛋白的表达差异(C)及统计分析(D)。* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图4 敲低MX2协同Reo感染对COC1/DDP细胞内质网应激的影响

本研究仍存在一定局限性。首先, MX2 敲低后病毒复制增加、ROS 升高与凋亡激活的共同发生, 其因果或平行关系尚需进一步验证。此外, 线粒体作为 ROS 主要来源, 其功能变化未被直接评估。其次, 此外, 本研究未系统评估 MX2 调控对肿瘤免疫微环境的影响。鉴于溶瘤病毒的核心优势在于诱导免疫原性死亡并激发抗肿瘤免疫应答^[31-32], 后续将探究 MX2 敲低是否能增强抗肿瘤免疫应答。最后, siRNA 敲低策略距离临床应用仍有差距, 开发 MX2 小分子抑制剂是实现临床转化的关键

综上所述, 本研究揭示 MX2 是调控 Reo 在肿瘤细胞, 特别是耐药细胞中复制与溶瘤敏感性的关键宿主限制因子。靶向 MX2 可通过“增强病毒复制—诱导 ROS 积累—激活内质网应激—促进凋亡”这一级联机制, 显著提升 Reo 的抗肿瘤效应, 为克服溶瘤病毒在低敏感肿瘤中的疗效瓶颈提供了新思路和在增敏靶点。

[参考文献]

[1] MONDAL M, GUO J G, HE P, et al. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy[J]. Hum Vaccines Immunother, 2020, 16 (10): 2389-2402. DOI:10.1080/21645515.2020.1723363.
 [2] COHN D E, SILL M W, WALKER J L, et al. Randomized phase II B evaluation of weekly paclitaxel versus weekly paclitaxel with oncolytic reovirus (Reolysin®) in recurrent ovarian, tubal, or peritoneal cancer: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group

study[J]. Gynecol Oncol, 2017, 146(3): 477-483. DOI: 10.1016/j.ygyno.2017.07.135.
 [3] MAHALINGAM D, FOUNTZILAS C, MOSELEY J, et al. A phase II study of REOLYSIN® (pelareorep) in combination with carboplatin and paclitaxel for patients with advanced malignant melanoma[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2017, 79(4): 697-703. DOI:10.1007/s00280-017-3260-6.
 [4] ROULSTONE V, TWIGGER K, ZAIDI S, et al. Synergistic cytotoxicity of oncolytic reovirus in combination with cisplatin-paclitaxel doublet chemotherapy[J]. Gene Ther, 2013, 20(5): 521-528. DOI:10.1038/gt.2012.68.
 [5] RUSSELL S J, PENG K W, BELL J C. Oncolytic virotherapy[J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(7): 658-670. DOI:10.1038/nbt.2287.
 [6] KENNEDY B E, MURPHY J P, CLEMENTS D R, et al. Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase enhances the antitumor efficacy of oncolytic reovirus[J]. Cancer Res, 2019, 79(15): 3824-3836. DOI:10.1158/0008-5472.can-18-2414.
 [7] CUI B P, SONG L F, WANG Q, et al. Non-small cell lung cancers (NSCLCs) on colysis using coxsackievirus B5 and synergistic DNA-damage response inhibitors[J]. Sig Transduct Target Ther, 2023, 8: 366. DOI:10.1038/s41392-023-01603-4.
 [8] FELT S A, MOERDYK-SCHAUWECKER M J, GRZELISHVILI V Z. Induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by vesicular stomatitis virus[J]. Virology, 2015, 474: 163-173. DOI: 10.1016/j.virol.2014.10.026.
 [9] PAVLOVIC J, ZÜRCHER T, HALLER O, et al. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein[J]. J Virol, 1990, 64(7): 3370-3375. DOI:10.1128/jvi.64.7.3370-3375.1990.
 [10] KUECK T, BLOYET L M, CASSELLA E, et al. Vesicular

- stomatitis virus transcription is inhibited by TRIM69 in the interferon-induced antiviral state[J]. *J Virol*, 2019, 93(24): e01372-e01319. DOI:10.1128/jvi.01372-19.
- [11] REN Y, CHEN M L, WU G X, et al. High accumulation of Mx2 renders limited multiplication of oncolytic herpes simplex virus-1 in human tumor cells[J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 21227. DOI:10.1038/s41598-021-00691-y.
- [12] SCHILLING M, BULLI L, WEIGANG S, et al. Human MxB protein is a pan-herpesvirus restriction factor[J]. *J Virol*, 2018, 92(17): e01056-e01018. DOI:10.1128/jvi.01056-18.
- [13] SERRERO M C, GIRAULT V, WEIGANG S, et al. The interferon-inducible GTPase MxB promotes capsid disassembly and genome release of herpesviruses[J]. *eLife*, 2022, 11: e76804. DOI:10.7554/elife.76804.
- [14] BARER L, SCHRÖDER S K, WEISKIRCHEN R, et al. Lipocalin-2 regulates the expression of interferon-stimulated genes and the susceptibility of prostate cancer cells to oncolytic virus infection[J]. *Eur J Cell Biol*, 2023, 102(2): 151328. DOI: 10.1016/j.ejcb.2023.151328.
- [15] FRIAS-DE-DIEGO A, CRISCI E. Use of crystal violet to improve visual cytopathic effect-based reading for viral titration using TCID50 assays[J]. *JoVE*, 2022(180): e63063. DOI:10.3791/63063.
- [16] GEOFFROY K, VIENS M, KALIN E M, et al. The small GTPase ran increases sensitivity of ovarian cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus[J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(12): 1662. DOI:10.3390/ph17121662.
- [17] SCHÄFER T E, KNOL L I, HAAS F V, et al. Biomarker screen for efficacy of oncolytic virotherapy in patient-derived pancreatic cancer cultures[J]. *eBioMedicine*, 2024, 105: 105219. DOI:10.1016/j.ebiom.2024.105219.
- [18] GROENEVELDT C, KINDERMAN P, GRIFFIOEN L, et al. Neutralizing antibodies impair the oncolytic efficacy of reovirus but permit effective combination with T cell - based immunotherapies [J]. *Cancer Immunol Res*, 2024, 12(3): 334-349. DOI:10.1158/2326-6066.cir-23-0480.
- [19] WISNIEWSKI M L, WERNER B G, HOM L G, et al. Reovirus infection or ectopic expression of outer capsid protein $\mu 1$ induces apoptosis independently of the cellular proapoptotic proteins bax and bak[J]. *J Virol*, 2011, 85(1): 296-304. DOI:10.1128/jvi.01982-10.
- [20] CLARKE P, DEBIASI R L, GOODY R, et al. Mechanisms of reovirus-induced cell death and tissue injury: role of apoptosis and virus-induced perturbation of host-cell signaling and transcription factor activation[J]. *Viral Immunol*, 2005, 18(1): 89-115. DOI: 10.1089/vim.2005.18.89.
- [21] QU Y, WANG S Y, JIANG H, et al. Newcastle disease virus infection induces parthanatos in tumor cells *via* calcium waves[J]. *PLoS Pathog*, 2024, 20(12): e1012737. DOI: 10.1371/journal.ppat.1012737.
- [22] XING Y J, LV X, CHEN X, et al. Maackiain induces apoptosis and autophagy *via* ROS-mediated endoplasmic reticulum stress in endometrial cancer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 147: 113935. DOI:10.1016/j.intimp.2024.113935.
- [23] HEIBER J F, XU X X, BARBER G N. Potential of vesicular stomatitis virus as an oncolytic therapy for recurrent and drug-resistant ovarian cancer[J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30(12): 805-814. DOI:10.5732/ejc.011.10205.
- [24] PANDA D, GJINAJ E, BACHU M, et al. IRF1 maintains optimal constitutive expression of antiviral genes and regulates the early antiviral response[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1019. DOI:10.3389/fimmu.2019.01019.
- [25] BETANCOR G, JIMENEZ-GUARDEÑO J M, LYNHAM S, et al. MX2-mediated innate immunity against HIV-1 is regulated by serine phosphorylation[J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6(8): 1031-1042. DOI:10.1038/s41564-021-00937-5.
- [26] STAEHELI P, HALLER O. Human MX2/MxB: a potent interferon-induced postentry inhibitor of herpesviruses and HIV-1[J]. *J Virol*, 2018, 92(24): e00709-e00718. DOI:10.1128/jvi.00709-18.
- [27] WANG Y X, NIKLASCH M, LIU T T, et al. Interferon-inducible MX2 is a host restriction factor of hepatitis B virus replication[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(5): 865-876. DOI:10.1016/j.jhep.2019.12.009.
- [28] YI D R, AN N, LIU Z L, et al. Human MxB inhibits the replication of hepatitis C virus[J]. *J Virol*, 2019, 93: e01285-e01218. DOI: 10.1128/jvi.01285-18.
- [29] KELLY K R, ESPITIA C M, MAHALINGAM D, et al. Reovirus therapy stimulates endoplasmic reticular stress, NOXA induction, and augments bortezomib-mediated apoptosis in multiple myeloma[J]. *Oncogene*, 2012, 31(25): 3023-3038. DOI:10.1038/ncr.2011.478.
- [30] CAREW J S, ESPITIA C M, ZHAO W, et al. Reolysin is a novel reovirus-based agent that induces endoplasmic reticular stress-mediated apoptosis in pancreatic cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(7): e728. DOI:10.1038/cddis.2013.259.
- [31] LIU S Y, LI F, MA Q Q, et al. OX40L-armed oncolytic virus boosts T-cell response and remodels tumor microenvironment for pancreatic cancer treatment[J]. *Theranostics*, 2023, 13(12): 4016-4029. DOI:10.7150/thno.83495.
- [32] CHEN X Y, ZHAO J, YUE S, et al. An oncolytic virus delivering tumor-irrelevant bystander T cell epitopes induces anti-tumor immunity and potentiates cancer immunotherapy[J]. *Nat Cancer*, 2024, 5(7): 1063-1081. DOI:10.1038/s43018-024-00760-x.

[收稿日期] 2025-09-07

[修回日期] 2026-01-07

[本文编辑] 邢一凡