

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.06.006

· 基础研究 ·

麻疹-流行性腮腺炎-风疹联合减毒活疫苗通过诱导免疫原性细胞死亡激活三阴性乳腺癌抗肿瘤免疫

蒋立娜^{1a}, 王峰², 魏洪^{1b}, 赵倩^{1a}, 何俊^{1a}, 迟茜文^{1b}, 魏弋林^{1c}, 何嫣然^{1d}, 符鹏诚^{1d} (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. 生物工程学院; d. 临床医学院, 贵州 安顺 561113; 2. 贵州省人民医院 急诊外科, 贵州 贵阳 550005)

[摘要] **目的:** 探讨麻疹-流行性腮腺炎-风疹联合减毒活疫苗(MMR)通过诱导免疫原性细胞死亡(ICD)对三阴性乳腺癌(TNBC)的免疫调节机制。**方法:** 体外实验采用CCK-8法检测MMR对TNBC细胞4T1和MDA-MB-231存活率的影响, 免疫荧光法检测MDA-MB-231细胞中钙网蛋白(CALR)表达, 磷钼酸比色法检测MDA-MB-231细胞内ATP的含量, ELISA检测细胞上清液中高迁移率族蛋白B1(HMGB1)的表达水平, 通过GEPIA网站分析CALR和HMGB1对乳腺癌患者生存期的影响。体内实验中经皮下注射4T1-Luc细胞于雌性BALB/c小鼠乳腺脂肪垫构建TNBC小鼠模型。设Control组、盐酸阿霉素(Dox)组、MMR组, 按照分组每两天静脉给药1次, 连续给药3次。动物活体成像系统观察肿瘤体积变化; 记录小鼠体重及各器官指数初步评估疫苗安全性; H-E染色观察肿瘤病理变化; 免疫组化和Western blotting检测肿瘤中CALR和HMGB1蛋白的表达。流式细胞术分析小鼠脾T淋巴细胞亚群及肿瘤树突状细胞和巨噬细胞比例; 免疫组化检测肿瘤CD8⁺T淋巴细胞浸润; ELISA检测血清中促炎细胞因子IL-6和TNF- α 含量。**结果:** MMR对4T1细胞的活性抑制作用较弱; MMR对MDA-MB-231细胞抑制率达90.39% ($P < 0.001$)。与Control组相比, MMR组MDA-MB-231细胞中ICD相关蛋白(CALR、ATP、HMGB1)表达上调 ($P < 0.001$)。GEPIA网站分析表明, CALR和HMGB1高表达的患者总生存期有所延长。MMR延缓了荷瘤小鼠肿瘤体积增长 ($P < 0.001$), 延长小鼠的生存期, 且28 d内MMR组荷瘤小鼠体重与Control组无显著性差异 ($P > 0.05$); H-E染色显示, 与Control组相比, MMR组小鼠肿瘤组织坏死区域扩大且有免疫细胞浸润; MMR上调肿瘤ICD相关蛋白CALR、HMGB1的表达水平; MMR组脾CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞及肿瘤树突状细胞和M1型巨噬细胞的比例增加 ($P < 0.05$), CD8⁺T淋巴细胞在肿瘤组织中的浸润增加 ($P < 0.001$), 且促炎细胞因子IL-6和TNF- α 水平升高 ($P < 0.01$)。**结论:** MMR减毒活疫苗对TNBC的抗肿瘤作用可能与诱导肿瘤发生ICD进而激活抗肿瘤免疫相关。

[关键词] 麻疹-流行性腮腺炎-风疹联合减毒活疫苗; 三阴性乳腺癌; 免疫原性细胞死亡; 抗肿瘤免疫

[中图分类号] R737.9; R730.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)06-0641-10

Live attenuated measles, mumps and rubella vaccine induces immunogenic cell death to activate anti-tumor immunity in triple-negative breast cancer

JIANG Lina^{1a}, WANG Hao², WEI Hong^{1b}, ZHAO Qian^{1a}, HE Jun^{1a}, CHI Qianwen^{1b}, WEI Yilin^{1c}, HE Yanran^{1d}, FU Pengcheng^{1d} (1. a. Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences; b. National Experimental Teaching Center for Basic Medicine; c. School of Bioengineering; d. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Anshun 561113, Guizhou, China; 2. Department of Emergency Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550005, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the immunomodulatory mechanisms of the live attenuated measles, mumps and rubella vaccine (MMR) against triple-negative breast cancer (TNBC) *via* induction of immunogenic cell death (ICD). **Methods:** *In vitro* experiments: The CCK-8 assay was used to evaluate the effect of MMR on the viability of TNBC cell lines 4T1 and MDA-MB-231. Immunofluorescence was performed to detect the expression of calreticulin (CALR) in MDA-MB-231 cells. ATP was measured using a phosphomolybdic acid colorimetric assay, and high mobility group box 1 (HMGB1) levels in the cell supernatant were determined by ELISA. The GEPIA database was used to analyze the correlation between CALR/HMGB1 expression and the overall survival of breast

[基金项目] 贵州省科技厅基础研究项目(黔科合作基础-ZK[2024]125); 贵州省卫生健康委-科学技术基金(gzwbkj2023-280); 贵州省重点实验室项目(ZDSYS[2023]004); 贵州省中央引导地方科技发展资金项目(黔科合[2025]024), 国家科技部及教育部高等学校学科创新引智计划(D20009); 2024年国家级、省级大学生创新训练项目(2024106600555, S2024106601437X, S2024106601441X)

[作者简介] 蒋立娜, 女, 硕士生

[通信作者] 魏洪(扫码获取作者通信方式)



cancer patients. *In vivo* experiments: A TNBC mouse model was established by subcutaneous injection of 4T1-Luc cells into the mammary fat pad of female BALB/c mice. The mice were divided into three groups: Control group, doxorubicin hydrochloride (Dox) group, and MMR group. According to the grouping, intravenous administration was performed once every two days for a total of three consecutive doses. Tumor volume changes were monitored using an *in vivo* imaging system. Body weight and organ indices were recorded for preliminary safety assessment of vaccine. Histopathological changes in tumors were observed by hematoxylin-eosin (H-E) staining. The expression of CALR and HMGB1 in tumor tissues was detected by immunohistochemistry and Western blotting. Flow cytometry was used to analyze T lymphocyte subsets in the spleen, as well as the proportions of dendritic cells and macrophages in tumor. Immunohistochemistry was performed to detect CD8⁺ T lymphocyte infiltration in tumor tissues. The levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in serum were measured by ELISA. **Results:** MMR showed weak inhibitory effect on the viability of 4T1 cells but inhibited MDA-MB-231 cells by 90.39% ($P < 0.001$). Compared with the Control group, the MMR group exhibited upregulated expression of ICD-related proteins CALR, ATP and HMGB1 in MDA-MB-231 cells ($P < 0.001$). GEPIA database analysis indicated that patients with high expression of CALR and HMGB1 had prolonged survival. *In vivo* experiments, MMR delayed tumor volume growth ($P < 0.001$) and extended mouse survival. Within 28 days, there was no significant difference in body weight between the MMR group and the Control group ($P > 0.05$). H-E staining showed enlarged necrotic areas and immune cell infiltration in tumor tissues from the MMR group compared with the Control group. MMR upregulated the expression levels of the ICD-related proteins CALR and HMGB1. In the MMR group, the proportions of splenic CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes, as well as tumor-infiltrating dendritic cells and M1-type macrophages, were increased ($P < 0.05$). CD8⁺ T lymphocyte infiltration into tumors was also increased ($P < 0.001$), and the level of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α was upregulated ($P < 0.01$). **Conclusion:** The tumor-suppressive effect of the MMR vaccine on TNBC may be associated with the induction of ICD in tumors, thereby activating anti-tumor immunity.

[Key words] measles, mumps and rubella vaccine (MMR); triple-negative breast cancer (TNBC); immunogenic cell death (ICD); antitumor immunity

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(6): 641-650. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.06.006]

乳腺癌是全球女性常见恶性肿瘤之一,严重威胁女性健康^[1]。其中三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是乳腺癌的一种特殊亚型,约占所有乳腺癌病例的15%~20%^[2]。现有治疗手段主要是采取手术切除配合放化疗和内分泌治疗^[3-5]。患者接受紫杉类、铂类、蒽环类等一线化疗药物治疗常发生不良反应且极易产生耐药性^[6]。因此亟须寻找新的有效治疗策略。溶瘤病毒疗法是一种新兴的肿瘤生物疗法^[7-10]。人用病毒性减毒活疫苗经人工减毒处理后仍保持病毒活性,研究发现其具有作为溶瘤病毒的潜力^[11-13],为肿瘤免疫治疗提供了新的可能性。

麻疹-流行性腮腺炎-风疹联合减毒活疫苗(measles, mumps and rubella vaccine, MMR)是由麻疹病毒(沪191株)、腮腺炎病毒(S79株)、风疹病毒(BRD II株)3种减毒病毒联合制备的疫苗,目前广泛应用于儿童免疫规划^[14],但在肿瘤治疗领域的研究尚处于起步阶段。研究^[15]表明,MMR可将胶质母细胞瘤细胞的细胞周期阻滞在G0/G1期,抑制其增殖,抑制率达95%。MMR可增加结肠癌小鼠肿瘤中CD4⁺和CD8⁺ T淋巴细胞的数量,激活固有免疫和适应性免疫,从而延缓肿瘤的生长^[16]。MMR干预能显著延长肝癌荷瘤小鼠生存期,上调肿瘤MHC-I类分子及转运蛋白复合物表达,增强肿瘤细胞免疫原性,并增加肿瘤内CD8⁺ T淋巴细胞比例^[17]。上述研究结果提示,MMR具有一定的抗肿瘤潜力,其机制主要与激

活免疫系统、调控T淋巴细胞有关。然而,目前较少见该疫苗在TNBC中的研究报道。

免疫原性细胞死亡(immunogenic cell death, ICD)是调节性细胞死亡的一种,在激活适应性免疫反应方面起着重要作用。溶瘤病毒是一种II型ICD诱导剂,在干预肿瘤细胞后,肿瘤细胞释放出一系列损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP),包括钙网蛋白(calreticulin, CALR)、高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)、ATP等。这些分子能够被树突状细胞表面的特定模式识别受体识别,进而引发固有免疫和适应性免疫反应,将“冷”肿瘤转变为“热”肿瘤,逆转肿瘤的免疫逃逸和免疫抑制状态^[18]。TUYAERTS等^[19]研究表明,表达FMS样酪氨酸激酶3(FMS-like tyrosine kinase 3, FLT3)的溶瘤单纯疱疹病毒可以在体外杀死黑色素瘤、胶质母细胞瘤和胰腺癌细胞,并通过促进HMGB1的表达进一步诱导ICD。同时,该病毒可在体内增加肿瘤组织中树突状细胞的比例。溶瘤牛疱疹病毒(bovine herpesvirus, BoHV)可促进CALR蛋白在黑色素瘤荷瘤小鼠中的表达,增强肿瘤组织中CD8⁺ T细胞的浸润^[18]。综上,ICD是溶瘤病毒对肿瘤发挥免疫调节作用的重要机制,其中对HMGB1及CALR的调控尤为重要。

本研究分别在体外细胞实验和体内TNBC荷瘤小鼠模型两个方面,探讨MMR能否有效诱导肿瘤细

胞发生ICD,并进一步明确其对肿瘤微环境中关键免疫细胞(包括树突状细胞、巨噬细胞和CD8⁺T淋巴细胞)的调控作用,进而评估MMR对TNBC的抑瘤效果。本研究为开发成熟疫苗再应用和安全有效的TNBC免疫治疗新策略提供思路。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒及实验动物

TNBC细胞MDA-MB-231、4T1为本实验室保存,整合萤光素酶报告基因的4T1-Luc细胞购自苏州海星生物科技有限公司;MMR冻干剂(批号:S20070026)由上海生物制品研究所有限责任公司赠送,使用前采用0.5 mL生理盐水复溶即为原液。MMR的半数组织培养感染剂量(50% tissue culture infectious dose, TCID₅₀)为 1×10^4 /mL,活性成分为麻疹病毒、风疹病毒(滴度均 $\geq 3.0 \lg \text{CCID}_{50}$)和腮腺炎病毒(滴度 $\geq 4.3 \lg \text{CCID}_{50}$),辅料包含蔗糖、明胶、谷氨酸钠、尿素、人血白蛋白。

雌性,8周龄,体重(20 ± 2)g,SPF级BALB/c小鼠,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0008。饲养温度为22~25℃,湿度为50%~80%。本实验经由贵州医科大学伦理委员会审核批准(2400608)。实验在生物安全二级(biosafety level 2, BSL-2)实验室完成,实验产生废料经121℃高压灭菌30 min后处理。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清购自浙江四季青公司,10×青-链霉素购自上海BBI公司,高糖DMEM培养基、0.25%胰蛋白酶均购自美国Gibco公司,HyperFluor 488标记的羊抗兔IgG抗体购自上海伟寰生物科技有限公司,牛血清白蛋白购自苏州新赛美生物有限公司,Triton X-100、抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)均购自武汉赛维尔生物有限公司,HMGB1的ELISA检测试剂盒购自武汉科鹿公司,ATP含量检测试剂盒购自武汉贝茵莱公司,盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, Dox)购自上海麦克林公司,流式抗体Anti-CD3 PE、Anti-CD4 FITC、Anti-CD8 APC、Anti-CD45-PerCP/Cyanine、Anti-CD11c-APC、Anti-F4/80 FITC、Anti-CD206 APC、Anti-CD86 PE均购自武汉Elabscience公司, HMGB1、CALR抗体均购自美国Bioworld公司,β-actin抗体购自武汉三鹰生物有限公司,CD8α抗体购自美国Affinity生物有限公司,HRP标记的山羊抗兔抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,飞克特超敏ECL发光液购自大连美仑生物技术有限公司,DAB显色液、苏木精均购自北京索莱宝生物有限公司,TNF-α、IL-6的ELISA试剂盒购自江苏酶免实业有限公司。

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,细胞计数仪购自深圳瑞沃德公司,电泳仪购自北京六一仪器厂,CO₂培养箱购自太仓斯高医疗器械科技有限公司,冷冻离心机购自上海卢湘仪离心仪器有限公司,激光共聚焦显微镜购自日本Olympus公司,小动物活体成像仪购自美国珀金埃尔默公司。

1.3 细胞培养与分组

MDA-MB-231细胞、4T1细胞均培养于含10%胎牛血清、1%青-链霉素的DMEM完全培养基,置37℃,5% CO₂培养箱进行培养。培养24 h,待细胞贴壁后,MMR组加入0.1 mL倍比稀释的MMR(分别为原液浓度的100%、50%、25%、12.5%),Control组加入DMEM。

1.4 CCK-8法检测MMR对TNBC细胞存活率的影响

将4T1、MDA-MB-231细胞以 5×10^4 个/mL密度分别加入96孔板中,培养24 h,待细胞贴壁后,按照分组加入使用DMEM倍比稀释的MMR(分别为原液浓度的100%、50%、25%、12.5%),空白组无细胞,孔中仅含DMEM。分别培养24、48和72 h,每孔加入0.1 mL CCK-8工作液,37℃作用2 h后于450 nm波长处检测各孔光密度(D)值,按照公式“细胞存活率=[(实验组D值-空白组D值)/(Control组D值-空白组D值)]×100%”计算细胞存活率。

1.5 免疫荧光染色检测MDA-MB-231细胞中CALR蛋白表达

取对数生长期MDA-MB-231细胞接种于细胞爬片上,37℃培养24 h。按照分组每孔加入300 μL对应浓度MMR,培养48 h。PBS清洗2次,加入4%多聚甲醛于4℃固定1 h。PBS清洗3次,加入0.2% Triton X-100室温穿透20 min, PBS清洗3次,加入5% BSA,于37℃封闭2 h。取出爬片放入新的6孔板中,加入CALR抗体(1:1 000)于4℃过夜处理;PBS清洗3次,加入HyperFluor 488标记的羊抗兔IgG抗体(1:1 000)于37℃避光处理2 h;PBS洗3次,将爬片倒置于预先滴加了抗荧光淬灭封片剂的载玻片上,避光保存。激光共聚焦显微镜观察,ImageJ(v1.53)软件进行图像量化处理。

1.6 磷钼酸比色法检测MDA-MB-231细胞内ATP含量

取对数生长期的MDA-MB-231细胞接种于24孔板中培养24 h,MMR组分别加入如1.3节所述的对浓度MMR,干预48 h后每孔加1 mL Tris-HCl提取液制备胞内样品(用于ATP检测)。后续操作按试剂盒说明书进行。

1.7 ELISA法检测MDA-MB-231细胞上清液中HMGB1及小鼠血清促炎因子IL-6和TNF-α的水平

取对数生长期的MDA-MB-231细胞接种于24

孔板中培养24 h, MMR组分别加入如1.3节所述的对应浓度MMR, 干预48 h后收取细胞上清液(用于检测HMGB1)。

小鼠采用1.5%异氟烷麻醉后摘眼球取血于1.5 mL无菌离心管中, 4℃静置30 min, $800 \times g$ 于4℃离心15 min, 收取上层血清(用于检测IL-6和TNF- α)。

后续操作按相应试剂盒说明书进行, 最后用酶标仪在450 nm波长下测定各孔 D 值。

1.8 GEPIA 网站分析CALR 和HMGB1 表达对乳腺癌患者生存期的影响

使用GEPIA网站(<http://gepia.cancer-pku.cn>)的Survival Plots模块, 分别输入基因名称“HMGB1”和“CALR”, 选择癌症类型为乳腺癌, 分析两个基因表达水平对乳腺癌患者生存期的影响。

1.9 TNBC 荷瘤小鼠肿瘤模型的建立^[20]

取对数生长期的4T1-Luc细胞, 将细胞密度调整到 2×10^6 个/mL, 经皮下注射于BALB/c小鼠左侧第二乳腺脂肪垫(0.1 mL/只)。待肿瘤体积达到100 mm³时, 视为造模成功。将荷瘤小鼠随机分组, 按照100 μ L/只的剂量, 每组小鼠分别静脉给予无菌PBS、6.25 mg/kg Dox(Dox是临床上广泛用于乳腺癌治疗的化疗药物, 具有明确的抗肿瘤活性, 将MMR疫苗的抗肿瘤效果与Dox进行直接比较, 可以评估MMR的相对疗效。)、MMR(0.5 mL生理盐水复溶后稀释10倍, 该浓度由预实验确定为抑瘤效果最佳浓度), 分别命名为Control组、Dox组、MMR组, 每2 d给药1次, 连续给药3次。

1.10 荷瘤小鼠生物学指标监测与肿瘤病理情况分析

实验期间每2天记录小鼠体质量及肿瘤体积(肿瘤体积 = $0.5 \times \text{长径} \times \text{宽径}^2$), 并通过动物活体成像系统观察荷瘤小鼠肿瘤变化, 同时记录小鼠生存状态以绘制生存曲线。于第28天采用1.5%异氟烷麻醉处死小鼠, 取心、肝、脾、肺、双肾, 称重并计算器官指数, 器官指数 = (器官质量/小鼠体质量) $\times 100\%$ 。剥离小鼠肿瘤, 称重后取部分肿瘤组织置于4%多聚甲醛中室温固定24 h, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋后切片, 进行H-E染色, 在显微镜下观察组织病理情况。

1.11 免疫组织化学染色法检测肿瘤组织中HMGB1、CALR 蛋白表达及CD8⁺ T淋巴细胞浸润

将新鲜小鼠肿瘤组织采用冰冻切片机切片后, 加入4%多聚甲醛固定10 min, PBS清洗3次后用快速封闭液封闭20 min。加入HMGB1、CALR、CD8a抗体(1:200稀释)4℃作用过夜, PBS清洗3次, 滴加HRP标记的山羊抗兔抗体(1:200)于37℃作用1 h, PBS清洗3次, 滴加DAB显色10 min, 苏木精染色数秒, 流水冲洗后, 中性树脂胶封片, 显微镜下拍照记

录, 采用ImageJ(v 1.53)软件进行图像量化处理。

1.12 Western blotting 检测肿瘤HMGB1、CALR 蛋白的表达

取肿瘤组织25 mg, 加裂解液后组织研磨1 min, 冰浴30 min, $12\ 000 \times g$ 离心10 min, 取上清, 以1:4的比例加入加上样缓冲液, 沸水煮10 min提取蛋白。SDS-PAGE电泳分离蛋白, 转膜, 脱脂奶粉室温封闭2 h, 加入HMGB1、CALR、 β -actin抗体(1:2 000)4℃作用过夜。次日加入TBST清洗5次后加入HRP标记的山羊抗兔抗体(1:2 000), 于室温作用2 h, TBST洗膜3次, ECL发光液显影, 采用ImageJ(v1.53)软件进行图像量化处理。

1.13 流式细胞术检测脾T淋巴细胞亚群及肿瘤组织中树突状细胞与巨噬细胞的比例

取荷瘤小鼠脾和肿瘤组织各25 mg, 剪刀剪碎后分别置于10 mL组织解离液中, 37℃作用1 h后使用70 μ m细胞筛网过滤, 得到单细胞悬液, 加入红细胞裂解液, 离心弃上清液, 加入CD3、CD4、CD8、CD45、CD11c、F4/80、CD206、CD86抗体, 混匀后置于4℃避光反应30 min, 加入细胞染色缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪进行检测, FlowJo软件分析实验数据。

1.14 统计学处理

采用SPSS 24.0、GraphPad Prism 8.0统计学软件分析作图, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异采用单因素方差分析, 组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 MMR 体外抑制TNBC 细胞的作用具有细胞选择性

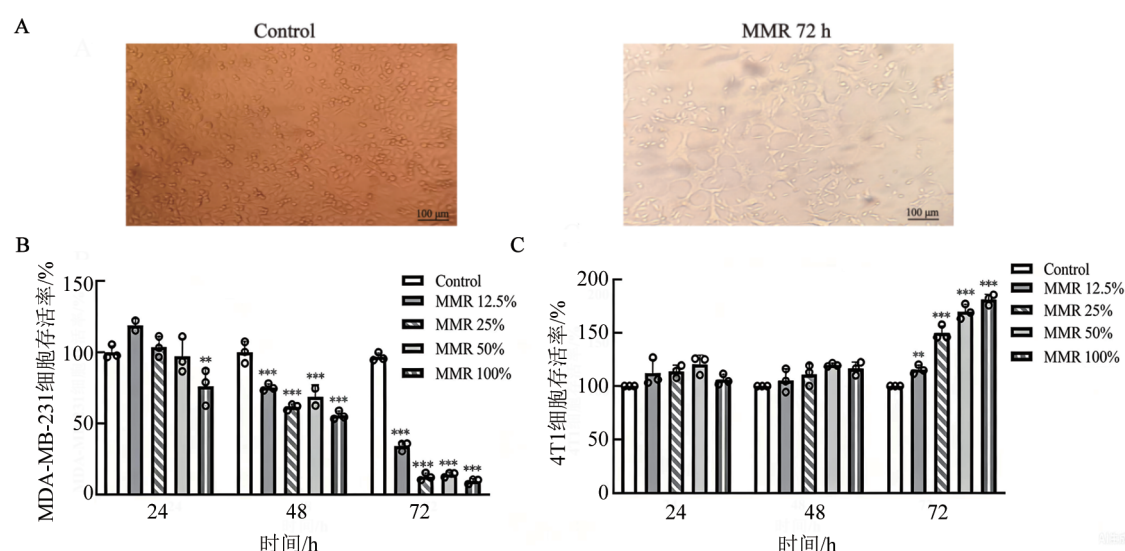
体外实验中, MMR对MDA-MB-231细胞具有直接抑制作用, 且呈时间和剂量依赖性。显微镜下观察(图1A)发现, MMR处理72 h后, MDA-MB-231细胞出现明显合胞体形态; CCK-8法检测MMR对MDA-MB-231和4T1细胞存活率的影响, 结果(图1B、C)显示, MDA-MB-231细胞于36和72 h时, 在100%、50%、25%和12.5% MMR浓度下存活率均显著下降(均 $P < 0.001$)。相比之下, MMR对4T1细胞无抑制作用, 反而呈浓度和时间依赖性促进其增殖。上述结果表明, MMR体外处理能显著抑制人源TNBC细胞MDA-MB-231活性, 而对鼠源TNBC细胞4T1无显著杀伤作用。

2.2 MMR 上调MDA-MB-231 细胞DAMP 表达

免疫荧光染色结果(图2A、B)显示, 与Control组相比, MMR(100%、50%浓度)组CALR蛋白表达显著上调($P < 0.001$, $P < 0.01$), 提示MMR可诱导人源TNBC细胞株MDA-MB-231中CALR蛋白的表达。

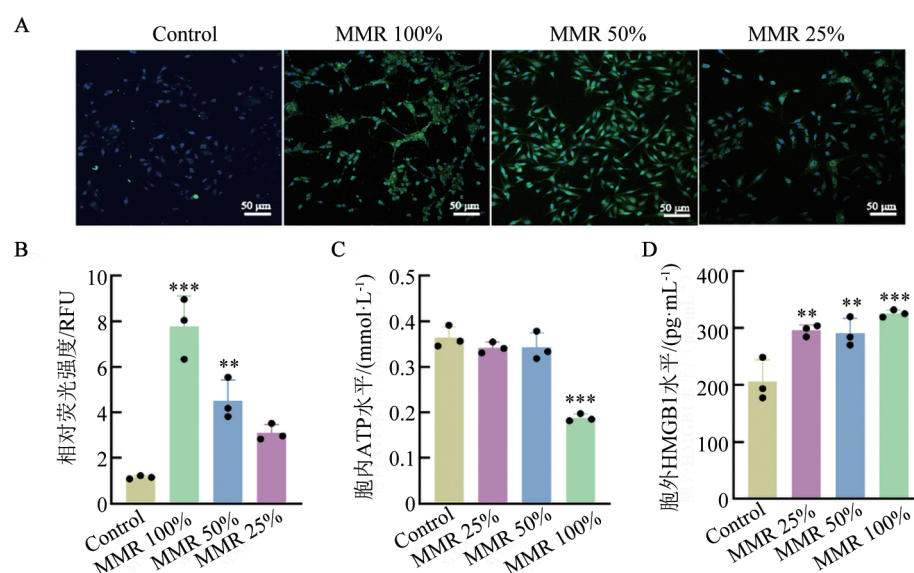
ATP检测结果(图2C)显示,随着MMR浓度增加,胞内ATP含量呈下降趋势。其中,与Control组相比,MMR 100%浓度组细胞的ATP含量显著减少($P < 0.001$)。HMGB1的ELISA检测结果(图2D)显

示,与Control组相比,MMR 100%浓度组细胞的HMGB1水平上调最显著($P < 0.001$)。结果提示,MMR可诱导MDA-MB-231细胞中HMGB1的释放,降低胞内ATP含量。



A:MMR处理72 h前后,MDA-MB-231细胞形态图;B:CCK-8法检测不同浓度MMR处理不同时间后MDA-MB-231细胞的存活率($n = 3$);C:CCK-8法检测不同浓度MMR处理不同时间后4T1细胞的存活率($n = 3$)。与Control组相比** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图1 MMR对不同TNBC细胞存活率的影响



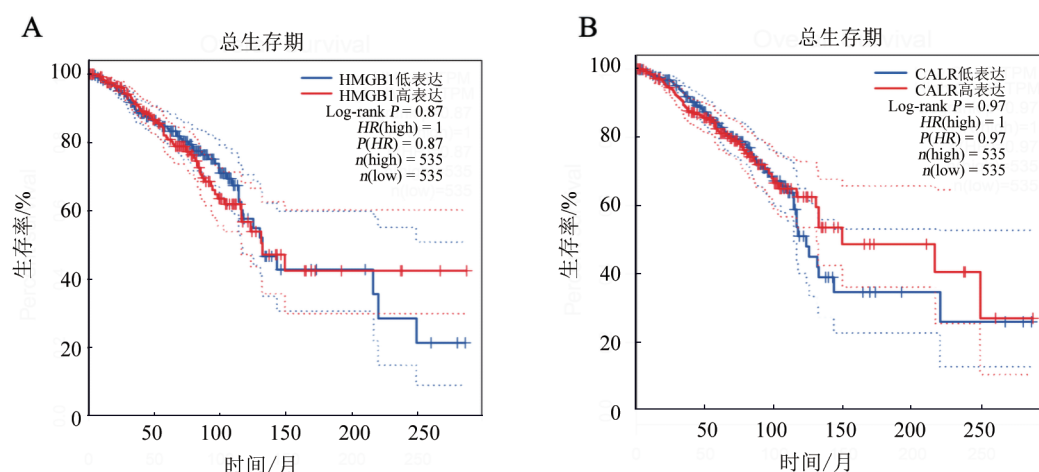
A:不同浓度MMR干预MDA-MB-231细胞后CALR蛋白(绿色荧光)与DAPI核染色(蓝色荧光)定位图;B:CALR蛋白相对荧光表达量统计图($n = 3$);C:磷钼酸比色法检测不同浓度MMR处理后MDA-MB-231细胞内ATP含量($n = 3$);D:ELISA法检测不同浓度MMR处理后MDA-MB-231细胞外HMGB1水平($n = 3$)。与Control组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图2 MMR对MDA-MB-231细胞DAMP表达的影响

2.3 HMGB1和CALR高表达影响乳腺癌患者总生存期

为进一步探究CALR和HMGB1的临床预后价值,本研究利用GEPIA数据库分析了两者的表达水平与乳腺癌患者总生存期的关系,结果(图3)表明,与HMGB1低表达的乳腺癌患者($n = 535$)相比,

HMGB1高表达的乳腺癌患者($n = 535$)的总生存期呈延长趋势,但差异无统计学意义($HR = 0.87$, $P > 0.05$)。类似地,CALR高表达的乳腺癌患者也显示出总生存期延长的趋势,但未达到统计学显著水平($HR = 0.97$, $P > 0.05$)。



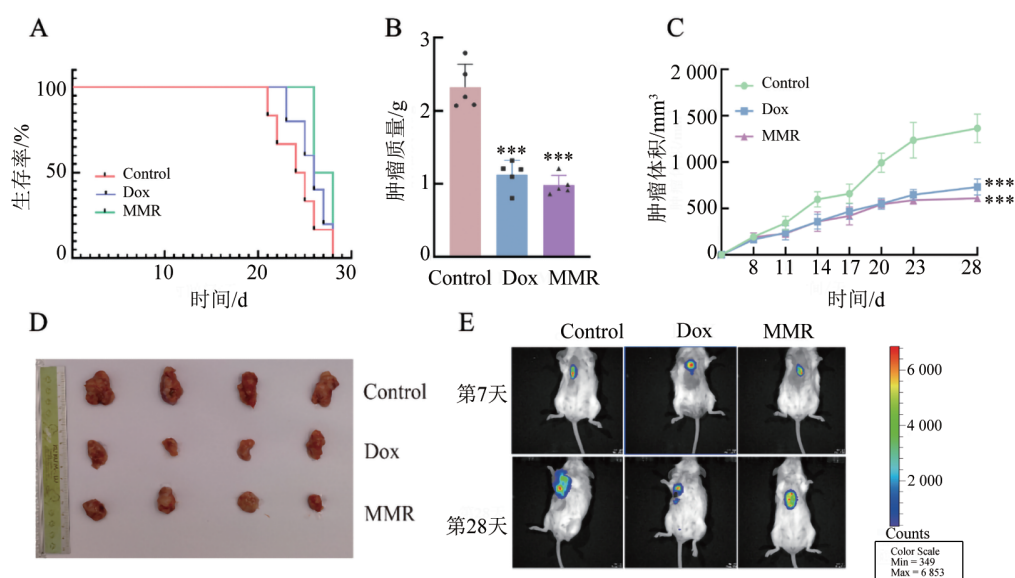
A: HMGB1 表达水平与乳腺癌患者生存期的关系; B: CALR 表达水平与乳腺癌患者生存期的关系。

图3 HMGB1和CALR表达水平与乳腺癌患者生存期的关系

2.4 MMR 延缓 4T1 荷瘤小鼠肿瘤体积增长并延长生存期

与 Control 组相比, MMR 干预后荷瘤小鼠生存期有所延长, 但差异无统计学意义(图 4A, $P > 0.05$)。

与 Control 组相比, Dox 组和 MMR 组荷瘤小鼠的肿瘤终末质量显著降低(图 4B, $P < 0.001$), 肿瘤终末体积均显著减小(图 4C~E, 均 $P < 0.001$)。



A: 各组荷瘤小鼠生存曲线($n = 10$); B~E: 各组荷瘤小鼠肿瘤质量(B, $n = 5$)、肿瘤体积变化曲线(C, $n = 5$)、实体肿瘤代表性图像(D)及动物活体成像代表性图像(E)。与 Control 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图4 MMR对4T1荷瘤小鼠抑瘤效果评价

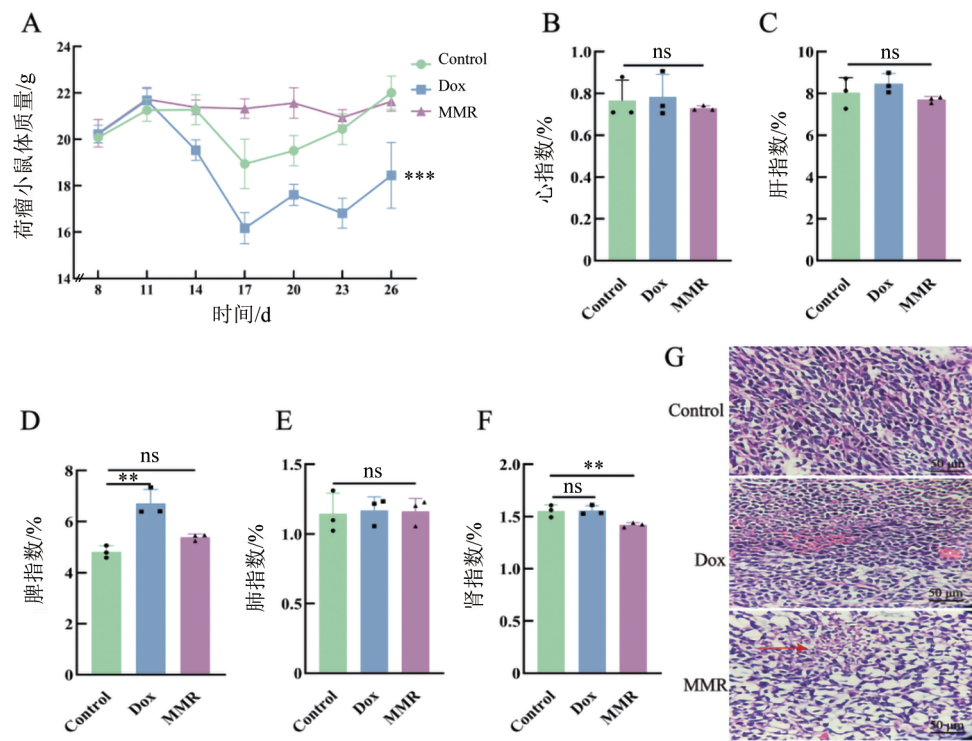
2.5 MMR 对荷瘤小鼠体内安全性与肿瘤病理的影响

各组荷瘤小鼠体质量监测结果(图 5A)显示, 28 d 内, 与 Control 组比, MMR 组小鼠体质量变化无明显差异, 而 Dox 组小鼠体质量显著下降($P < 0.001$)。器官指数结果(图 5B~F)显示, 与 Control 组相比, Dox 组脾指数升高($P < 0.01$), MMR 组肾指数下降($P < 0.01$)。H-E 染色结果(图 5G)显示, Control 组荷瘤小鼠肿瘤组织中可见肿瘤细胞密集排列, 结构紊乱, 异型性显著, 核分裂象多见, 提示高增殖活性。Dox 组荷瘤小鼠肿瘤

组织坏死灶边缘可见粉染均质无定形物质, 肿瘤细胞显示核固缩、核碎裂、局部血管破裂伴红细胞渗出。MMR 组肿瘤组织结构中肿瘤细胞排列稀疏, 核碎裂、核固缩状细胞增多, 且伴随少量炎性细胞浸润。

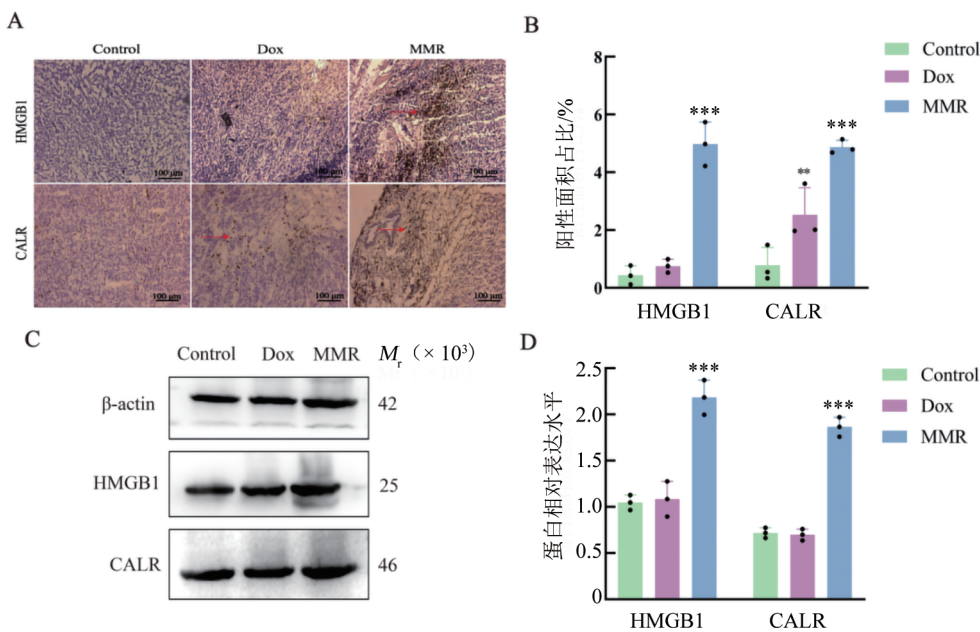
2.6 MMR 上调肿瘤组织中 HMGB1 和 CALR 蛋白的表达

免疫组化和 Western blotting 结果(图 6)显示, 与 Control 组相比, MMR 组荷瘤小鼠肿瘤组织中 HMGB1、CALR 蛋白表达水平升高(均 $P < 0.001$)。



A: 各组荷瘤小鼠体重变化; B-F: 各组荷瘤小鼠心指数(B)、肝指数(C)、脾指数(D)、肺指数(E)及肾指数(F); G: 各组荷瘤小鼠肿瘤组织H-E染色病理组织结构图。与Control组相比, ns表示 $P > 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图5 MMR对4T1荷瘤小鼠的体内安全性及肿瘤组织病理形态的影响



A、B: 荷瘤小鼠肿瘤组织免疫组化图(A, 褐色为阳性表达)及量化统计图(B, $n = 3$); C、D: 荷瘤小鼠肿瘤组织HMGB1、CALR蛋白免疫印迹条带图(C)及灰度值量化统计图(D, $n = 3$)。与Control组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

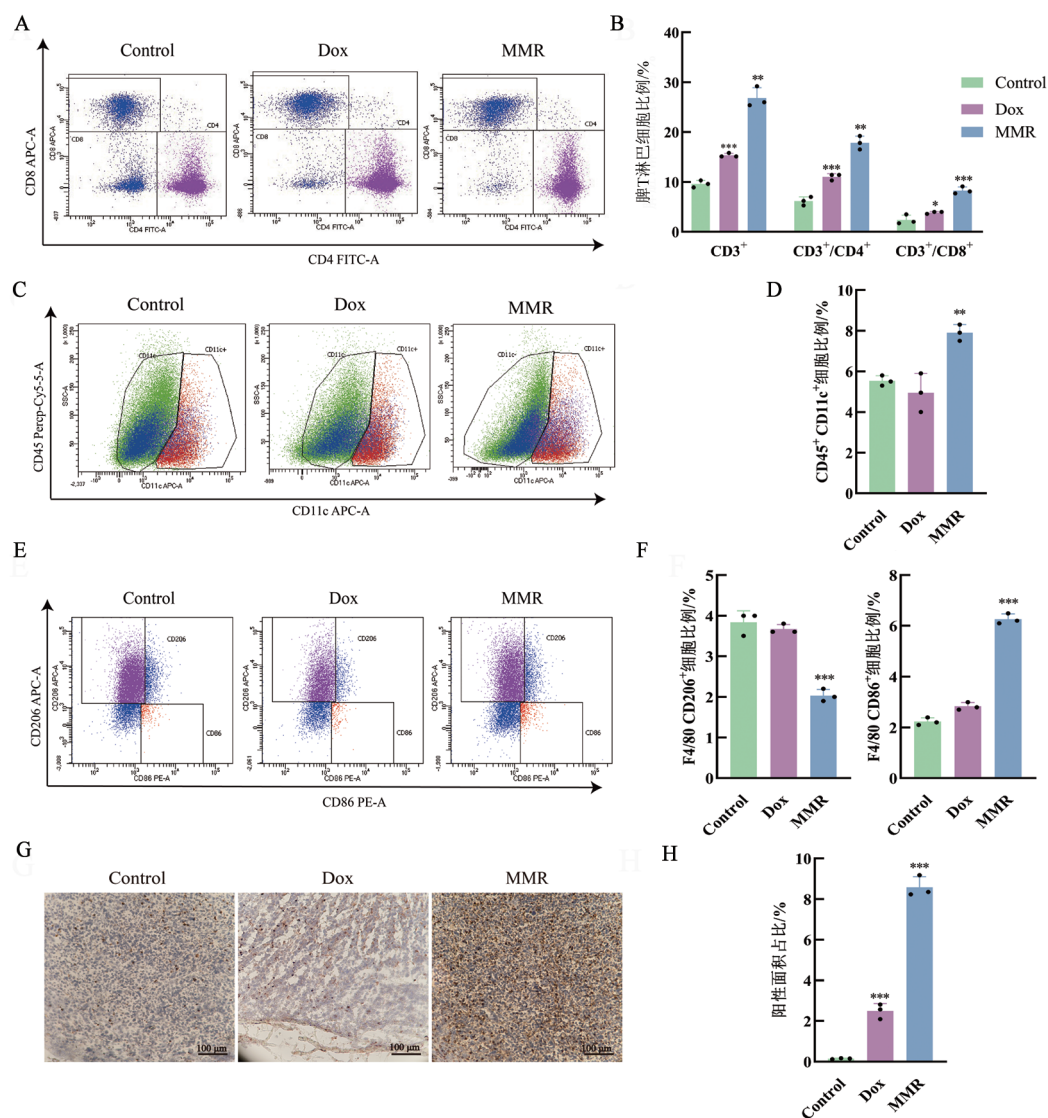
图6 4T1荷瘤小鼠肿瘤组织HMGB1和CALR蛋白表达

2.7 MMR增加脾T淋巴细胞及肿瘤浸润免疫细胞比例

流式细胞术结果(图7A、B)显示, 与Control组相比, MMR组荷瘤小鼠脾组织中 $CD4^+$ T、 $CD8^+$ T淋巴细胞比例显著增加($P < 0.01$, $P < 0.001$)。与Control

组相比, MMR组树突状细胞比例增加(图7C、D, $P < 0.01$), M1型巨噬细胞比例增加, M2型巨噬细胞比例减少(图7E、F, 均 $P < 0.001$)。

免疫组化结果(图7G、H)显示, MMR组瘤组织中 $CD8^+$ T淋巴细胞显著增加($P < 0.001$)。



A、B: 各组荷瘤小鼠脾T淋巴细胞亚群分析图(A)及量化统计图(B, $n=3$); C、D: 肿瘤中树突状细胞流式分析图(C)及量化统计图(D, $n=3$); E、F: 肿瘤M1/M2型巨噬细胞流式分析图(E)及量化统计图(F, $n=3$); G、H: 肿瘤组织CD8⁺ T淋巴细胞免疫组化图(G, 褐色为阳性表达)及量化统计图(H, $n=3$)。与Control组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图7 MMR对荷瘤小鼠脾T细胞亚群及肿瘤浸润免疫细胞的影响

2.8 MMR提高4T1荷瘤小鼠血清中促炎因子IL-6与TNF- α 的水平

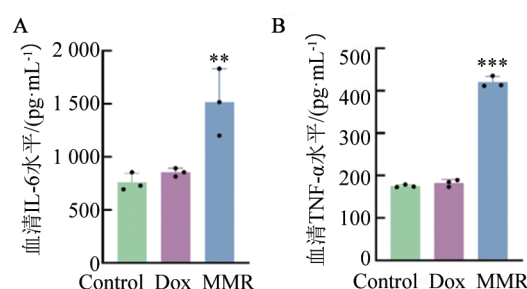
ELISA结果(图8)显示,与Control组相比,MMR组荷瘤小鼠血清中IL-6、TNF- α 水平显著升高($P<0.01$, $P<0.001$)。

3 讨论

TNBC现有的治疗手段易出现耐药且不良反应显著,因此需要寻找新的有效治疗方法。近年来肿瘤生物治疗成为研究的新焦点^[21]。溶瘤病毒疗法是其中一种新兴的肿瘤生物治疗方法,溶瘤病毒可通过直接利用病毒的复制能力破坏肿瘤细胞,或激活机体抗肿瘤免疫这两种途径来发挥溶瘤作用。

人用减毒活疫苗是常用于人类疾病预防的生物制剂,是经过减毒处理的活病毒株。减毒活疫苗可激活机体产生体液免疫和细胞免疫应答,具有溶瘤潜力。伪狂犬病病毒减毒活疫苗可通过与抗PD-1抗体联合作用增强肿瘤CD8⁺ T淋巴细胞浸润,重塑肾癌的肿瘤免疫微环境^[22]。ZHONG等^[23]研究表明,流行性乙型脑炎减毒活疫苗株可通过增加CD8⁺ T细胞浸润胶质母细胞瘤的肿瘤组织,重塑免疫抑制性肿瘤微环境。在结直肠癌和腹水瘤的体内实验中,MMR可延长小鼠的生存期,并能显著增加小鼠肿瘤内免疫细胞(包括T淋巴细胞、树突状细胞、巨噬细胞、NK细胞)的浸润^[16-17]。本研究结果显示,MMR干预后增加了4T1细胞荷瘤小鼠肿瘤组织中CD8⁺ T淋巴细胞、树突状细胞、M1型巨噬

细胞的比例,并且上调了血清中促炎细胞因子TNF- α 、IL-6的水平,与前述研究结果类似。提示MMR可调控4T1细胞荷瘤小鼠全身及肿瘤局部免疫微环境。



A: 各组荷瘤小鼠血清中IL-6水平($n=3$); B: 各组荷瘤小鼠血清中TNF- α 水平($n=3$)。与Control组比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图8 荷瘤小鼠血清促炎因子IL-6与TNF- α 水平

本研究体外实验表明MMR对人源TNBC细胞MDA-MB-231具有直接杀伤作用,但对于鼠源TNBC细胞4T1的杀伤作用较弱,仅在高浓度长时间干预下才呈现显著效果。病毒对细胞的识别吸附和穿入需要寻找到特异结合的细胞受体,不同物种间病毒受体的差异可能是导致MMR对4T1细胞无明显杀伤作用的原因之一。现有的研究表明,MMR发挥抑瘤作用主要通过对荷瘤小鼠的免疫调控尤其是对T淋巴细胞的调控作用。本研究选用免疫健全的BALB/c小鼠,皮下接种4T1细胞构建TNBC移植瘤模型,旨在最大程度模拟MMR作用于局部肿瘤免疫微环境及全身免疫系统的复杂调控。鉴于MMR在体外对4T1细胞直接杀伤作用较弱但体内仍有显著疗效,提示其抗肿瘤效应可能主要通过激活系统性抗肿瘤免疫实现。

ICD是溶瘤病毒抗肿瘤作用的主要机制。病毒感染可诱导肿瘤细胞内质网应激和活性氧超负荷,进而促使细胞释放DAMP。这些DAMP能够募集免疫细胞至肿瘤部位,将肿瘤微环境从“冷”转变为“热”^[24]。DAMP主要包括暴露于垂死细胞表面的CALR和细胞核释放到细胞周围的HMGB1和ATP。CALR是一种特异性结合钙离子的蛋白,主要定位于内质网,负责调控和储存钙离子,同时参与抗原提呈及危险信号传导,在诱导特异性免疫应答中发挥着重要作用。HMGB1是一种广泛存在于哺乳动物细胞核中的非组蛋白,能够被免疫细胞和肿瘤细胞分泌,并作为促炎介质,与免疫细胞表面的模式识别受体如TLR4、晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)结合,诱导炎症,并激活炎症小体或诱导细胞焦亡。麻疹病毒MeV-Edm干预人肝细胞癌细胞后促进了CALR的膜

易位及ATP和HMGB1的释放,诱导其发生ICD^[25]。有研究^[5]表明,静脉注射水疱性口炎病毒可以诱导4T1荷瘤小鼠肿瘤内ICD蛋白CALR及HMGB1的表达,从而促进CD8⁺T淋巴细胞和树突状细胞募集到肿瘤部位,激活抗肿瘤免疫。但目前尚少见关于MMR诱导ICD的溶瘤机制研究。在本研究中,MMR上调MDA-MB-231细胞及4T1荷瘤小鼠肿瘤组织中DAMP的表达。这些结果与上述研究一致。

综上,MMR对TNBC的抑制作用可能不仅与传统溶瘤病毒的直接杀伤有关,还与其诱导的免疫调节有关。本研究结果提示,MMR在癌症治疗领域展现出潜在的应用价值,为开发TNBC新疗法提供了实验依据。本研究具有一定的局限性。抗原特异性T细胞功能状态、树突状细胞成熟与交叉提呈能力,以及Treg、MDSC等精细免疫调控机制尚需深入探究。后续研究还应通过抗体阻断实验明确发挥主要抗肿瘤作用的免疫细胞亚群。

[参考文献]

- [1] 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. DOI:10.3322/caac.21834.
- [2] TESCH M E, PARTRIDGE A H. Treatment of breast cancer in young adults[J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2022(42): 795-806. DOI:10.1200/edbk_360970.
- [3] LEE J, KIM S H, KANG B J, et al. Imaging characteristics of young age breast cancer (YABC) focusing on pathologic correlation and disease recurrence[J]. Sci Rep, 2021, 11: 20205. DOI: 10.1038/s41598-021-99600-6.
- [4] LEON-FERRE R A, GOETZ M P. Advances in systemic therapies for triple negative breast cancer[J]. Bmj, 2023, 381: e071674. DOI: 10.1136/bmj-2022-071674.
- [5] 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]. J Immunother Cancer, 2021, 9(3): e002096. DOI:10.1136/jitc-2020-002096.
- [6] 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.
- [7] DELPEUT S, SISSON G, BLACK K M, et al. Measles virus enters breast and colon cancer cell lines through a PVRL4-mediated macropinocytosis pathway[J]. J Virol, 2017, 91(10): e02191-e02116. DOI:10.1128/jvi.02191-16.
- [8] BEHRENS M D, STILES R J, PIKE G M, et al. Oncolytic Urabe mumps virus: a promising virotherapy for triple-negative breast cancer[J]. Mol Ther Oncolytics, 2022, 27: 239-255. DOI:10.1016/j.omto.2022.11.002.
- [9] SHEN Y N, BAI X L, ZHANG Q, et al. Oncolytic virus VG161 in

- refractory hepatocellular carcinoma[J]. *Nature*, 2025, 641(8062): 503-511. DOI:10.1038/s41586-025-08717-5.
- [10] KHALID Z, COCO S, ULLAH N, et al. Anticancer activity of measles-mumps-rubella MMR vaccine viruses against glioblastoma [J]. *Cancers*, 2023, 15(17): 4304. DOI:10.3390/cancers15174304.
- [11] DE LOMBAERDE E, DE WEVER O, DE GEEST B G. Delivery routes matter: safety and efficacy of intratumoral immunotherapy [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer*, 2021, 1875(2): 188526. DOI:10.1016/j.bbcan.2021.188526.
- [12] SAMSON A, WEST E J, CARMICHAEL J, et al. Neoadjuvant intravenous oncolytic vaccinia virus therapy promotes anticancer immunity in patients[J]. *Cancer Immunol Res*, 2022, 10(6): 745-756. DOI:10.1158/2326-6066.cir-21-0171.
- [13] LI Z B, JIANG Z J, ZHANG Y X, et al. Efficacy and safety of oncolytic viruses in randomized controlled trials: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cancers*, 2020, 12(6): 1416. DOI: 10.3390/cancers12061416.
- [14] 熊萍, 王素婷, 许青, 等. 儿童8月龄和18月龄接种麻腮风联合减毒活疫苗的免疫原性和不良反应观察[J]. *中国疫苗和免疫*. 2026, 32(1): 27-33. DOI: 10.19914/j.CJVI.2026005.
- [15] LUO Y, LIN C L, REN W F, et al. Intravenous injections of a rationally selected oncolytic herpes virus as a potent virotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2019, 15: 153-165. DOI:10.1016/j.omto.2019.09.004.
- [16] ZHANG Y G, GABERE M, TAYLOR M A, et al. Repurposing live attenuated trivalent MMR vaccine as cost-effective cancer immunotherapy[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1042250. DOI:10.3389/fonc.2022.1042250.
- [17] TEFAY M Z, CIOU A, FERDOUS K U, et al. Multimodal reprogramming of the tumor microenvironment by MMR and dual checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma models[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1679665. DOI:10.3389/fimmu.2025.1679665.
- [18] DAVOLA M E, CORMIER O, VITO A, et al. Oncolytic BHV-1 is sufficient to induce immunogenic cell death and synergizes with low-dose chemotherapy to dampen immunosuppressive T regulatory cells[J]. *Cancers*, 2023, 15(4): 1295. DOI: 10.3390/cancers15041295.
- [19] TUYAERTS S, GEERAERTS X, REALE A, et al. Oncolytic HSV-1 expressing FLT3L kills melanoma, glioblastoma, and pancreatic cancer cells *in vitro* and induces immunogenic cell death[J]. *Mol Ther Oncol*, 2025, 33(3): 201031. DOI:10.1016/j.omton.2025.201031.
- [20] DE GRAAF J F, HUBERTS M, GROENEVELD D, et al. Comparison between intratumoral and intravenously administered oncolytic virus therapy with Newcastle disease virus in a xenograft murine model for pancreatic adenocarcinoma[J]. *Heliyon*, 2022, 8(7): e09915. DOI:10.1016/j.heliyon.2022.e09915.
- [21] ZHANG L, PAKMEHR S A, SHAHHOSSEINI R, et al. Oncolytic viruses improve cancer immunotherapy by reprogramming solid tumor microenvironment[J]. *Med Oncol*, 2023, 41(1): 8. DOI: 10.1007/s12032-023-02233-0.
- [22] LI W, WU F L, ZHAO S L, et al. Correlation between PD-1/PD-L1 expression and polarization in tumor-associated macrophages: a key player in tumor immunotherapy[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022, 67: 49-57. DOI:10.1016/j.cytogfr.2022.07.004.
- [23] DEL CARMEN RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ M, RODRÍGUEZ I G, NATTRESS C, et al. HDAC inhibitors enhance efficacy of the oncolytic adenoviruses ad $\Delta\Delta$ and ad-3 Δ -A20T in pancreatic and triple-negative breast cancer models[J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 1006. DOI:10.3390/v14051006.
- [24] 姚梦玮, 李玉迁, 徐庆胜, 等. 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[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(7): 568-576. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2023.07.004.
- [25] GUI M X, WU C X, QI R Y, et al. Swine pseudorabies virus attenuated vaccine reprograms the kidney cancer tumor microenvironment and synergizes with PD-1 blockade[J]. *J Med Virol*, 2024, 96(4): e29568. DOI:10.1002/jmv.29568.

[收稿日期] 2025-12-09

[修回日期] 2026-01-29

[本文编辑] 邢一凡