

论著·基础研究

大肠埃希菌外膜囊泡对乳腺癌细胞增殖及荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

王澜茜^{1,2}, 马官荣^{1,2}, 姜咏竹^{1,2}, 常秀林^{1,2}, 方廖琼¹, 白晋^{1,2}

1. 重庆医科大学生物医学工程学院, 超声医学工程国家重点实验室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学重庆市生物医学工程国家重点实验室, 重庆 400016

[摘要] **目的**·分析大肠埃希菌外膜囊泡 (*Escherichia coli* outer membrane vesicle, *E.coli*-OMV) 在体外对小鼠 4T1 乳腺癌细胞增殖的影响, 在体内对 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用。**方法**·从 *E.coli* 的培养上清液中收集 OMV 并进行表征。采用荧光标记追踪法检测 *E.coli*-OMV 被 4T1 细胞摄入的情况。采用 CCK-8 法测定 *E.coli*-OMV 对 4T1 细胞增殖的影响。采用流式细胞术检测 *E.coli*-OMV 对 4T1 细胞周期的影响。利用皮下接种法建立 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠模型, 而将小鼠分为 *E.coli*-OMV 组与对照 (Control) 组 (每组 10 只); 前者于每 2 d 注射 0.25 mg/kg *E.coli*-OMV, 后者则注射等剂量的 PBS。观察 2 组小鼠的体质量、40 d 生存率、肿瘤体积及质量变化, 采用苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, H-E 染色) 评价肿瘤组织的病理学形态, 采用免疫组织化学染色法观察肿瘤组织中增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 与细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 的表达情况。**结果**·*E.coli*-OMV 是粒径为 (216.00±18.30) nm 的球形膜囊结构, 可表达 *E.coli* 外膜蛋白 A (outer membrane protein A, OmpA) 与 OmpC。荧光显微镜的观察结果显示 4T1 细胞可摄入 *E.coli*-OMV。CCK-8 法的结果显示, *E.coli*-OMV 对 4T1 细胞的抑制作用与时间-剂量呈正相关。流式细胞术的结果显示, *E.coli*-OMV 将 4T1 细胞的生长周期阻滞于 G₀/G₁ 期。体内实验显示, 与 Control 组相比, *E.coli*-OMV 组小鼠的体质量在初期注射后稍有下降 ($P=0.031$), 而后出现回升; 其 40 d 生存率增加 ($P=0.037$); 该组小鼠肿瘤的体积、质量的增长量均较少 ($P=0.041$, $P=0.004$), 其肿瘤体积抑制率达 29.69%、肿瘤质量抑制率达 49.81%。H-E 染色的结果显示, *E.coli*-OMV 组小鼠肿瘤组织细胞核分裂象较 Control 组减少 ($P=0.038$)。免疫组织化学染色的结果显示, *E.coli*-OMV 组小鼠肿瘤组织中的 PCNA 及 CyclinD1 阳性表达较 Control 组减少 ($P=0.031$, $P=0.002$)。**结论**·体外研究与体内研究均表明, *E.coli*-OMV 可对 4T1 细胞的增殖产生明显的抑制作用。

[关键词] 细菌外膜囊泡; 乳腺癌; 细胞周期; 抑瘤作用**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.10.004 **[中图分类号]** R737.9 **[文献标志码]** A

Effects of *Escherichia coli* outer membrane vesicles on proliferation of breast cancer cells and tumor growth of tumor-bearing mice

WANG Lanxi^{1,2}, MA Guanrong^{1,2}, JIANG Yongzhu^{1,2}, CHANG Xiulin^{1,2}, FANG Liaoqiong¹, BAI Jin^{1,2}

1. State Key Laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering, College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective**·To analyze the effect of *Escherichia coli* outer membrane vesicle (*E.coli*-OMV) on the proliferation of 4T1 breast cancer cells *in vitro* and the inhibition of tumor growth in BALB/c-4T1 tumor-bearing mice *in vivo*. **Methods**·OMVs were collected from the culture supernatant of *E.coli* and characterized. The uptake of *E.coli*-OMV by 4T1 cells was detected by fluorescent label tracking method. The effect of *E.coli*-OMV on 4T1 cell proliferation was detected by CCK-8 method. The effect of *E.coli*-OMV on 4T1 cell cycle was detected by flow cytometry. The BALB/c-4T1 tumor-bearing mouse models were established by subcutaneous inoculation, and the mice were divided into *E.coli*-OMV group and Control group, with 10 mice in each group. The mice in the *E.coli*-OMV group were injected with 0.25 mg/kg *E.coli*-OMV every 2 d, while the mice in the Control group were injected with equal doses of PBS. The changes in body weight, 40 d survival rate, tumor volume and tumor weight of the two groups

[作者简介] 王澜茜 (1998—), 女, 硕士生; 电子信箱: 2962911834@qq.com。

[通信作者] 白晋, 电子信箱: sajinbai@cqmu.edu.cn。

[Corresponding Author] BAI Jin, E-mail: sajinbai@cqmu.edu.cn。

[网络首发] <https://link.cnki.net/urlid/31.2045.R.20230830.1330.002> (2023-08-30 17:43:52)。

of tumor-bearing mice were observed. The pathological morphology of the tumor tissues was evaluated by hematoxylin-eosin staining (H-E staining). The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and CyclinD1 in tumor tissues was observed by immunohistochemical staining. **Results** *E. coli*-OMV was spherical membrane vesicle structure with a particle size of (216.00±18.30) nm, which expressed *E. coli* outer membrane protein A (OmpA) and OmpC. Fluorescence microscopy results showed that 4T1 cells could intake *E. coli*-OMV. CCK-8 results showed that the inhibitory effect of *E. coli*-OMV on 4T1 cells was positively correlated with time-dose. Flow cytometry results showed that *E. coli*-OMV arrested the growth cycle of 4T1 cells in G₀/G₁ phase. *In vivo* experiments showed that compared with the Control group, body weight of mice in the *E. coli*-OMV group decreased slightly after the initial injection ($P=0.031$), and then recovered, while 40 d survival rate increased ($P=0.037$). The growth of tumor volume and weight of mice in *E. coli*-OMV group were lower than those in the Control group ($P=0.041$, $P=0.004$). Its tumor volume inhibition rate reached 29.69%, and tumor weight inhibition rate reached 49.81%. The results of H-E staining showed that nuclear splitting images of tumor tissues of mice in the *E. coli*-OMV group decreased compared to the Control group ($P=0.038$). The results of immunohistochemical staining showed that the positive expression of PCNA and CyclinD1 in the tumor tissues of mice in the *E. coli*-OMV group decreased compared to the Control group ($P=0.031$, $P=0.002$). **Conclusion** Both *in vitro* and *in vivo* studies show that *E. coli*-OMV can significantly inhibit the proliferation of 4T1 cells.

[Key words] bacterial outer membrane vesicle; breast cancer; cell cycle; tumor-suppressing effect

乳腺癌是女性易发且较为常见的恶性肿瘤，是世界女性癌症死亡的第二大原因^[1-2]。传统的乳腺癌治疗方法包括手术治疗、放射治疗、化学治疗等，但其效果均不够显著，使得新的癌症治疗策略有待继续开发。相关研究表明，微生物疗法或将能够为目前常规癌症疗法无法满足的临床需求提供全新的解决方案，如细菌介导的癌症疗法（bacteria-mediated cancer treatment, BMCT）已应用于临床诸多恶性肿瘤的治疗^[3]。研究^[4-5]显示，多种细菌[如大肠埃希菌（*Escherichia coli*, *E. coli*）]具有天然的肿瘤细胞杀伤能力，可诱导肿瘤细胞发生凋亡或使细胞增殖受到抑制，还可进入肿瘤区域通过细胞增殖来减少氧气和营养供应以形成坏死区域，使瘤区中心的肿瘤细胞死于饥饿和窒息，从而表现出良好的抗肿瘤效果。然而，细菌在肿瘤区域定植后发生的不可控制的大量繁殖会引发机体脓毒血症、感染性休克等较多不良反应，因此BMCT在临床上的应用仍存在巨大挑战^[6-7]。

细菌外膜囊泡（bacterial outer membrane vesicle, OMV）是由细菌释放的纳米颗粒^[8]。相较于细菌，OMV不可自主复制且具有更高的剂量可控性与生物安全性^[9-10]，同时其主要携带有亲本细菌的外膜蛋白、周质等成分，在功能上与亲本细菌具有相似性^[11-13]。基于此，本研究拟提取大肠埃希菌外膜囊泡（*Escherichia coli* outer membrane vesicle, *E. coli*-OMV），并探讨其对小鼠4T1乳腺癌细胞增殖、乳腺癌荷瘤小鼠模型肿瘤生长的抑制作用，以期为基于OMV的临床肿瘤治疗提供新思路。

1 对象与方法

1.1 细胞来源及培养

小鼠4T1乳腺癌细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司。使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基，在37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养，取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2 菌株来源与培养

大肠埃希菌BL21（DE3）菌株购自上海唯地生物技术有限公司。将冻存于-80℃的BL21（DE3）菌株接种于LB培养基，于37℃摇床培养20h后用于后续实验。

1.3 实验动物

使用健康BALB/c雌性小鼠20只，月龄6~8周，体质量20~25g[购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物生产许可证号为SCXK（湘）2019-0004]。所有实验动物均饲养于相同的标准实验环境中，即温度为（23±5）℃、湿度为（45±5）%、明暗周期为12h、自由摄食及饮水，动物使用许可证号为SYXK（渝）2018-0003。

1.4 主要试剂与仪器

CCK-8试剂盒（Dojindo，日本），胎牛血清、RPMI 1640培养基（Gibco，美国），增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen, PCNA）兔单克隆抗体、细胞周期蛋白D1（CyclinD1）兔单克隆抗体（上海碧云天生物技术有限公司），*E. coli*外膜蛋白A

(outer membrane protein A, OmpA) 多克隆抗体 (上海起发实验试剂有限公司), *E.coli* O157: H7 OmpC 多克隆抗体 (Thermo Fisher, 美国), 即用型免疫组化 Elivision™ Super 检测试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司), 增强型 DAB 显色试剂盒 (20×) (北京索莱宝科技有限公司)。

Amicon Ultra-15 100kDa 超滤离心管 (Millipore, 美国), Optima XPN-100 超高速离心机、CytoFLEX 流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国), INFINITE M PLEX 荧光多模式酶标仪 (Tecan, 瑞士), 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) (Hitachi, 日本)。

1.5 *E.coli*-OMV 的提取与鉴定

1.5.1 *E.coli*-OMV 的提取 采用超滤离心法制备 *E.coli*-OMV^[14]。在 4 °C、5 000×g 下离心含有 BL21 (DE3) 菌株的 LB 培养液, 获得上清液后依次使用 0.45 μm、0.22 μm 滤膜进行过滤, 并使用超滤离心管对滤液进行浓缩。而后, 在 4 °C、150 000×g 下超速离心上述浓缩液, 使用磷酸盐缓冲液 (sodium phosphate buffer, PBS) 重悬沉淀物后于 -80 °C 保存备用。

1.5.2 *E.coli*-OMV 的鉴定 使用 PBS 稀释新鲜制备的 *E.coli*-OMV 后, 采用纳米粒度仪对其粒径进行检测。采用 3% 半凝固琼脂糖包埋新鲜制备的 *E.coli*-OMV 沉淀后进行切片, 再通过 TEM 观察 *E.coli*-OMV 的形态。采用蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测 *E.coli*-OMV 的 OmpA、OmpC 的表达, 即取 5 μg 蛋白样品行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 经转膜封闭后依次孵育 OmpA、OmpC 一抗和相应二抗 (工作浓度均为 1:5 000), 最后使用 ECL 化学发光成像试剂进行显影。

1.6 4T1 细胞摄入 *E.coli*-OMV 的检测

使用 PKH67 外泌体绿色荧光标记染料对 *E.coli*-OMV 进行染色, 具体染色步骤参照其说明书。采用 PBS 重悬已标记好的 *E.coli*-OMV, 避光储存在 -80 °C。

将 4T1 细胞以 2×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 培养 12 h 后向每孔加入 2 mL 含有标记完成的 *E.coli*-OMV 的 RPMI 1640 完全培养基, 共培养 0、6、12 h。采用 DAPI 对细胞核进行染色, 而后用荧光显微镜观察

4T1 细胞对 *E.coli*-OMV 的摄入情况。

1.7 4T1 细胞增殖的检测

采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对 “1.5.1” 部分得到的 *E.coli*-OMV 进行外膜总蛋白浓度检测, 具体操作参见该试剂盒说明书。

将 4T1 细胞以 6×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 培养 12 h 后用含有不同浓度 *E.coli*-OMV 的 RPMI 1640 完全培养基 [*E.coli*-OMV 终浓度为 0 (Ctrl 组)、1、10、20、50 μg/mL] 分别培养 12、24、48 h。经 PBS 洗涤后, 向每孔加入 100 μL 含有 10% CCK-8 试剂的 RPMI 1640 完全培养基, 共孵育 1 h 后使用多功能酶标仪检测细胞的 *D* (450 nm)。细胞抑制率 (%) = $(1 - D_{E.coli-OMV} / D_{Ctrl}) \times 100\%$ 。

1.8 4T1 细胞周期的检测

将 4T1 细胞以 2×10^6 个/孔接种于 6 孔板中, 使用无血清 RPMI 1640 培养基培养 12 h, 对细胞进行饥饿处理。用含有不同浓度 *E.coli*-OMV 的 RPMI 1640 完全培养基 [*E.coli*-OMV 终浓度均为 0 (Ctrl 组)、5、10、20 μg/mL] 分别培养 12、24、48 h 后, 收集细胞并向其中加入 70% 冰乙醇, 于 4 °C 过夜行细胞固定。次日, 使用含 0.1% Triton X-100 的 PI 进行细胞膜透化并行 DNA 染色, 而后通过流式细胞仪对细胞周期进行检测。

1.9 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠模型建立及分组

将 100 μL 密度为 5×10^5 个/mL 的 4T1 细胞悬液注射于小鼠背部皮下, 10 d 后待肿瘤体积达 100 mm³ 则提示 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠模型建立成功。将该模型小鼠随机分为 *E.coli*-OMV 组和对照 (Control) 组, 每组 10 只。其中, 每 2 d 向 *E.coli*-OMV 组小鼠的肿瘤区域注射 *E.coli*-OMV 溶液 (浓度为 50 μg/mL, 单次剂量为 5 mL/kg), 共 5 次; 同时, Control 组小鼠注射等体积的 PBS。分别用于后续体质量及生存率测定实验 (每组 5 只), 以及肿瘤组织的体积、质量、抑制率测定实验 (每组 5 只)。

1.10 *E.coli*-OMV 抑瘤效果评估

1.10.1 小鼠体质量及生存率测定 从初次注射开始, 每 2 d 分别对 2 组小鼠进行称重, 该部分数据统计时间结点为第 20 日。末次注射后, 每日记录

各组小鼠发生死亡的数量；数据统计时间结点为第45日，对第45日后依然存活的小鼠按生存45 d计算。

1.10.2 肿瘤组织的体积及其抑制率测定 使用游标卡尺分别对2组小鼠肿瘤组织的长径 (L) 和短径 (W) 进行测量，计算肿瘤组织的体积 (V) 及其抑制率。公式为： $V(\text{mm}^3) = L \times W \times W \times 0.5$ ，肿瘤组织体积抑制率 (%) = $(V_{\text{Control}} - V_{E.coli-OMV}) / V_{\text{Control}} \times 100\%$ 。

1.10.3 肿瘤组织的质量及其抑制率测定 于注射结束后10 d处死小鼠，分别测量2组小鼠肿瘤组织的质量 (M) 并计算肿瘤组织质量抑制率。公式为：肿瘤质量抑制率 (%) = $(1 - M_{E.coli-OMV} / M_{\text{Control}}) \times 100\%$ 。

1.10.4 肿瘤组织的病理学变化分析 采用4%多聚甲醛对2组小鼠的肿瘤组织固定后，常规石蜡包埋并制成切片。行苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, H-E染色)，并通过光学显微镜观察肿瘤组织结构及细胞核分裂象。

1.10.5 肿瘤组织增殖标志物及周期蛋白表达的检测 采用免疫组织化学染色法对“1.10.4”部分得到的石蜡切片进行染色，其中一抗为PCNA、CyclinD1 (工作浓度均为1:100)，二抗使用即用型免疫组化Elivision™ Super试剂盒孵育，最后使用增强型

DAB显色试剂盒显色，具体步骤操作均依据相关说明书。通过光学显微镜观察组织阳性染色情况，并采用Image J软件计算阳性细胞染色的平均光密度。

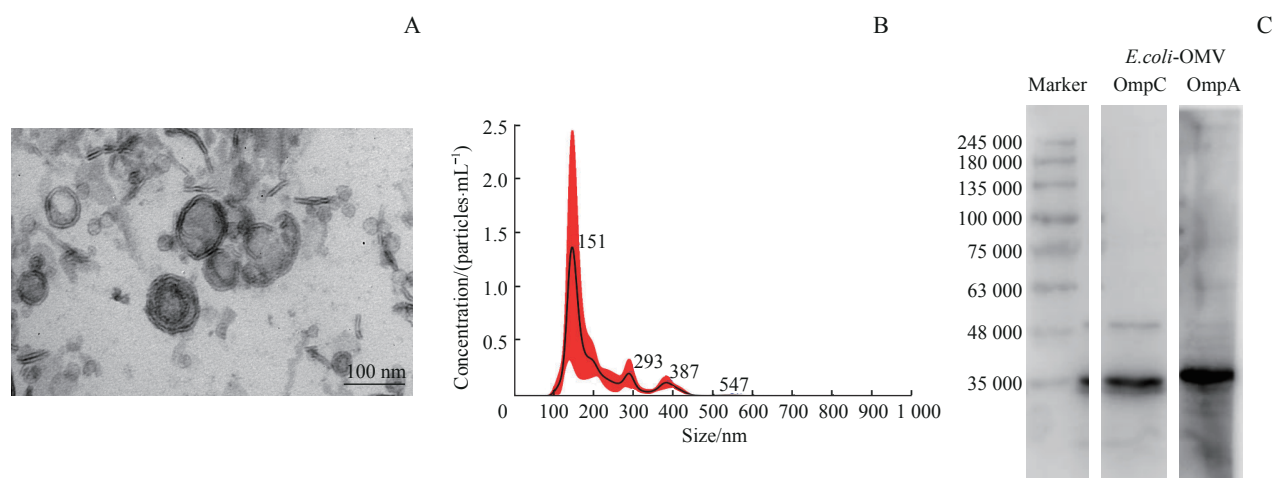
1.11 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0统计学软件进行分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，2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。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *E.coli*-OMV 的表征分析

本研究对 *E.coli*-OMV 的一般特征进行鉴定。TEM的观察结果 (图1A) 显示，*E.coli*-OMV 呈纳米级别的球形结构，具有脂质双层膜。纳米粒度仪的分析结果 (图1B) 显示，*E.coli*-OMV 的平均粒径为 (216.00 ± 18.30) nm。Western blotting的结果 (图1C) 显示，*E.coli*-OMV 在35 000和38 000处分别存在 *E.coli* 的外膜标志性蛋白，即OmpC和OmpA，继而证明其为 *E.coli* 外膜来源。



Note: A. Transmission electron micrograph of *E.coli*-OMV. B. Particle size distribution of *E.coli*-OMV. C. Detection of outer membrane marker proteins in *E.coli*-OMV by Western blotting.

图1 *E.coli*-OMV 的一般特征分析

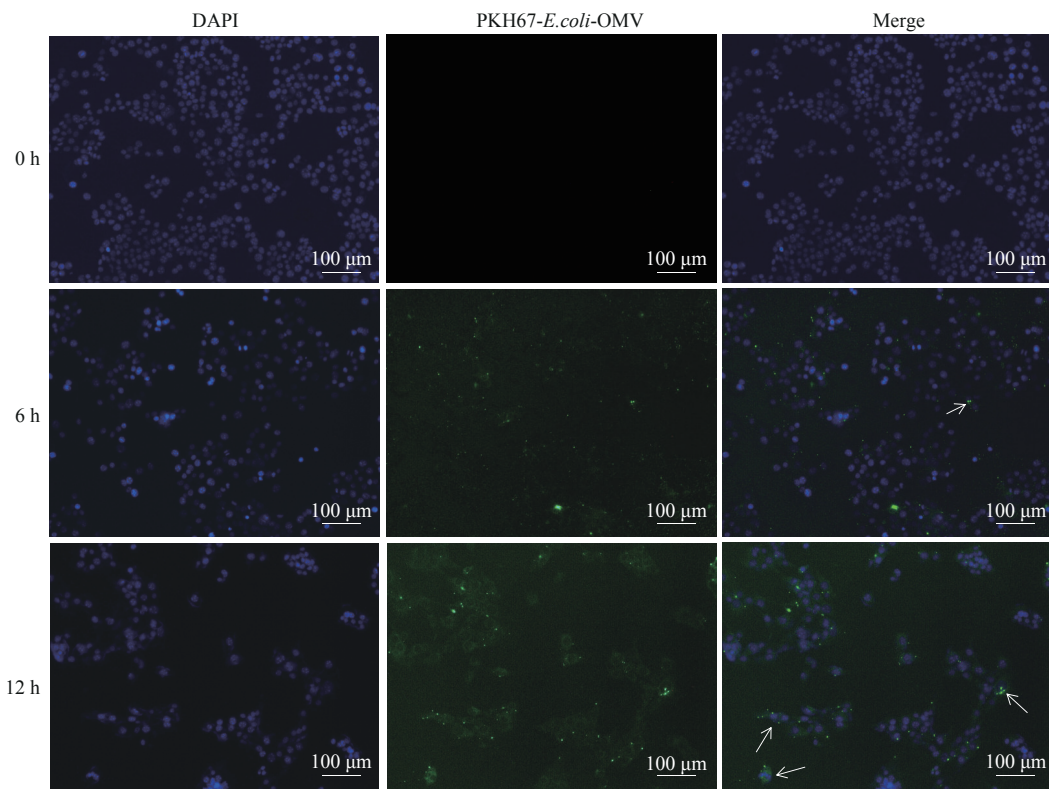
Fig 1 Analysis of the characterization of *E.coli*-OMV

2.2 4T1 细胞对 *E.coli*-OMV 的摄入观察

将荧光标记的 *E.coli*-OMV 与4T1细胞作用0、6、12 h后，结果 (图2) 显示，6 h时4T1细胞质中、细胞核附近出现了绿色荧光标记，12 h时荧光强度增加；继而提示，4T1细胞可摄入 *E.coli*-OMV。

2.3 *E.coli*-OMV 对4T1细胞增殖的影响

CCK-8实验的结果 (图3) 显示，*E.coli*-OMV 在1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下对4T1细胞增殖的影响较小；在10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下，对4T1细胞作用12 h的细胞抑制率分别为 $(2.76 \pm 0.98)\%$ 、 $(15.20 \pm 2.53)\%$ 、



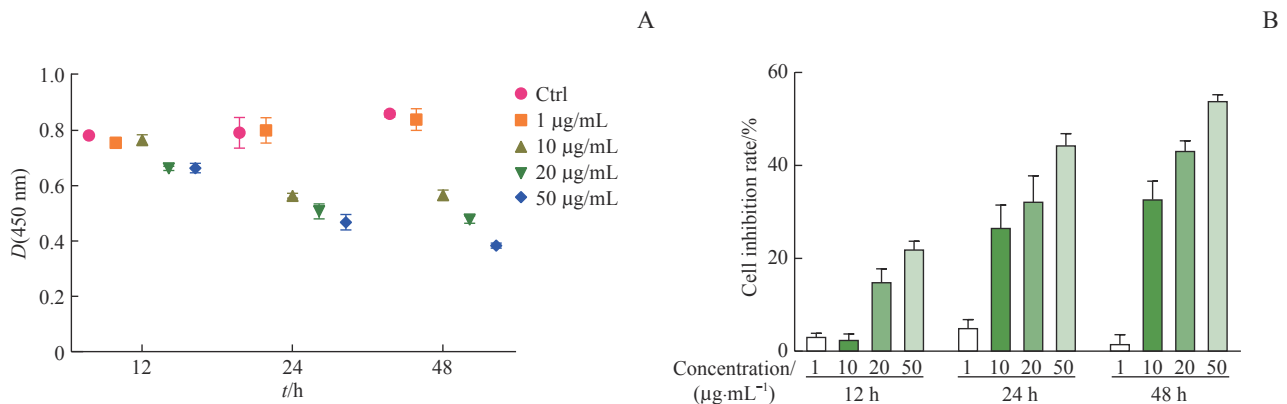
Note: Green fluorescence indicates PKH67-labelled *E.coli*-OMV, and white arrows indicate *E.coli*-OMV in the nucleus.

图2 4T1细胞对*E.coli*-OMV的摄入观察 (×100)

Fig 2 Observation on the uptake of *E.coli*-OMV by 4T1 cells (×100)

(22.33±1.15) %; 作用 24 h 的细胞抑制率分别为 (26.89±4.56) %、(32.51±5.25) %、(44.63±2.21) %; 作用 48 h 的细胞抑制率分别为 (33.00±

3.64) %、(43.48±1.85) %、(54.19±1.03) %。继而提示, *E.coli*-OMV可抑制4T1细胞的增殖, 且抑制效果呈时间-剂量依赖性。



Note: A. Effect of the different concentrations of *E.coli*-OMV on *D*(450 nm) of 4T1 cells at different time points. B. Analysis of the inhibition rate of *E.coli*-OMV at different concentrations on 4T1 cell proliferation under different time points.

图3 CCK-8法检测*E.coli*-OMV对4T1细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of *E.coli*-OMV on 4T1 cells proliferation by CCK-8 method

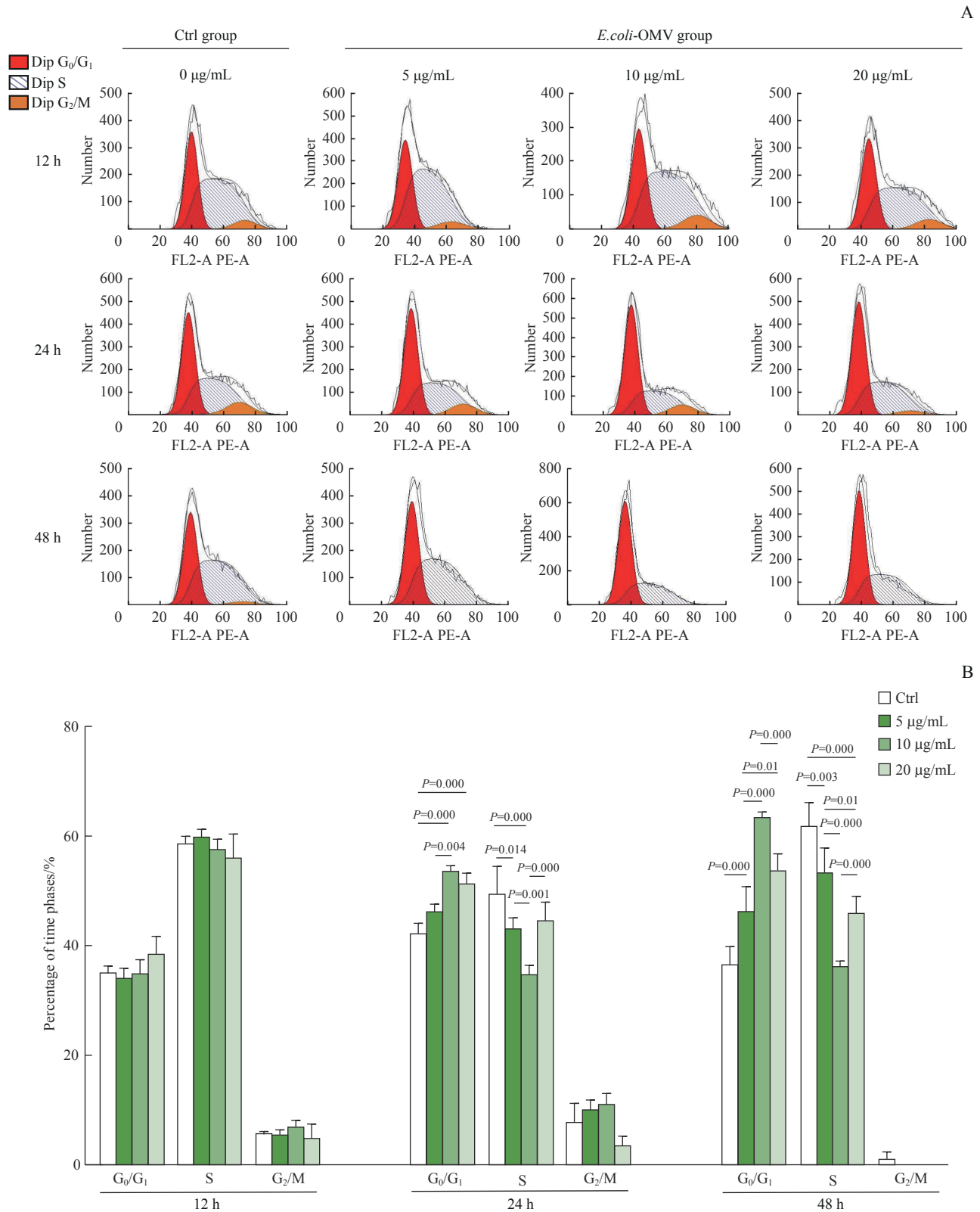
2.4 *E.coli*-OMV对4T1细胞周期的影响

采用流式细胞术检测 *E.coli*-OMV 对 4T1 细胞周期的影响, 结果 (图 4) 显示与 Ctrl 组相比, 经不同浓

度的 *E.coli*-OMV 处理的细胞在不同作用时间下处于 G₀/G₁ 期的占比有所增加, S 期占比减少; 其中, *E.coli*-OMV 浓度为 10 μg/mL 时对细胞周期的阻滞现象

最为明显；随着作用时间的增加，各个浓度 *E. coli*-OMV 抑制细胞周期 G_0/G_1 期程度也有增加。继而提示，

一定剂量的 *E. coli*-OMV 可以将 4T1 细胞的细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期，且阻滞效果呈明显的作用时间依赖性。



Note: A. Flow assay graphs of 4T1 cell cycle. B. Effect of different concentrations of *E. coli*-OMV on 4T1 cell cycle distribution at different time points.

图 4 流式细胞术检测 *E. coli*-OMV 对 4T1 细胞周期分布的影响

Fig 4 Effect of *E. coli*-OMV on 4T1 cell cycle distribution by flow cytometry

2.5 *E.coli*-OMV 对 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用

2.5.1 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠的一般情况观察 与 Control 组比较, *E.coli*-OMV 组小鼠在首次注射后的第 1~4 日精神状态欠佳, 竖毛, 活跃程度与注射前比较稍有下降; 在第 3 次注射时精神状况好转。5 次注射过程中, 2 组小鼠均未出现运动失调、活动受限、呼吸困难、烦躁等反应。

2.5.2 *E.coli*-OMV 对 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠体质量的影响 注射前, 2 组小鼠的平均体质量间差异无统计学意义。首次注射后 4 d, *E.coli*-OMV 组小鼠的平均体质量较 Control 组稍有下降 ($P=0.031$), 而后逐渐回升至与 Control 组持平, 最终 2 组小鼠的平均体质量间差异无统计学意义 (图 5)。继而提示, 初期注射 0.25 mg/kg 剂量的 *E.coli*-OMV 可使小鼠体质量有所下降, 而后则不会对小鼠体质量产生影响。

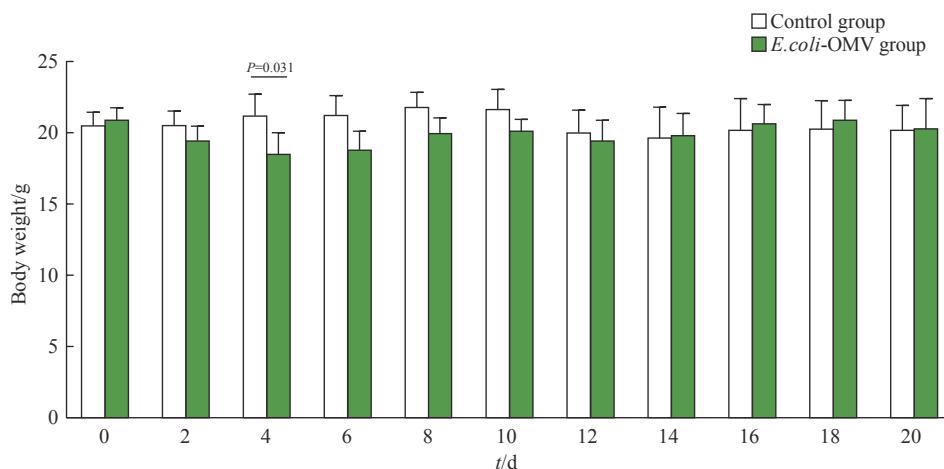


图 5 2 组 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠的体质量变化

Fig 5 Changes in body weight of BALB/c-4T1 tumor-bearing mice in the two groups

2.5.3 *E.coli*-OMV 对 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠生存率的影响 对 2 组小鼠的生存率进行观察, 结果 (图 6) 显示, 注射后第 26、32、40 d, Control 组小鼠生存率分别为 80% (4/5)、20% (1/5)、0 (0/5), *E.coli*-OMV 组小鼠生存率分别为 100% (5/5)、60% (3/5)、60% (3/5); 40 d 后, Control 组小鼠全部死亡, *E.coli*-OMV 组小鼠仍有存活, 组间差异具有统计学意义 ($P=0.037$)。继而提示, 0.25 mg/kg 剂量下的 *E.coli*-OMV 可以延缓由乳腺癌导致的小鼠死亡。

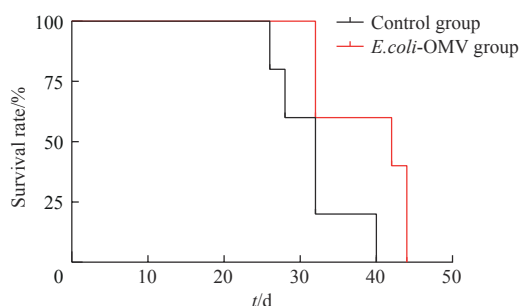


图 6 2 组 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠的生存率分析

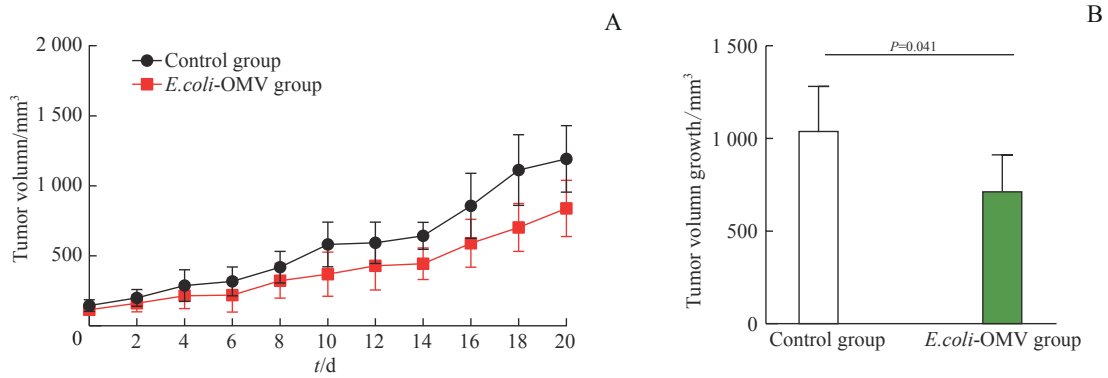
Fig 6 Survival rate analysis of BALB/c-4T1 tumor-bearing mice in the two groups

2.5.4 *E.coli*-OMV 对小鼠肿瘤体积的影响 注射前, 2 组小鼠肿瘤体积间差异无统计学意义。注射后, 2 组小鼠的肿瘤生长曲线如图 7A 所示; 在注射后 20 d, *E.coli*-OMV 组小鼠肿瘤体积增长量小于 Control 组 ($P=0.041$, 图 7B), 肿瘤体积抑制率达 29.69%。

Control 组, 肿瘤质量亦小于 Control 组且差异具有统计学意义 ($P=0.004$), 抑瘤率达到 49.81%。继而提示, 0.25 mg/kg 剂量下的 *E.coli*-OMV 可对小鼠 4T1 肿瘤生长有一定的抑制作用。

2.5.5 *E.coli*-OMV 对小鼠肿瘤质量的影响 对 2 组小鼠的肿瘤组织进行解剖观察, 结果 (图 8) 显示注射后 20 d, *E.coli*-OMV 组小鼠的肿瘤组织均小于

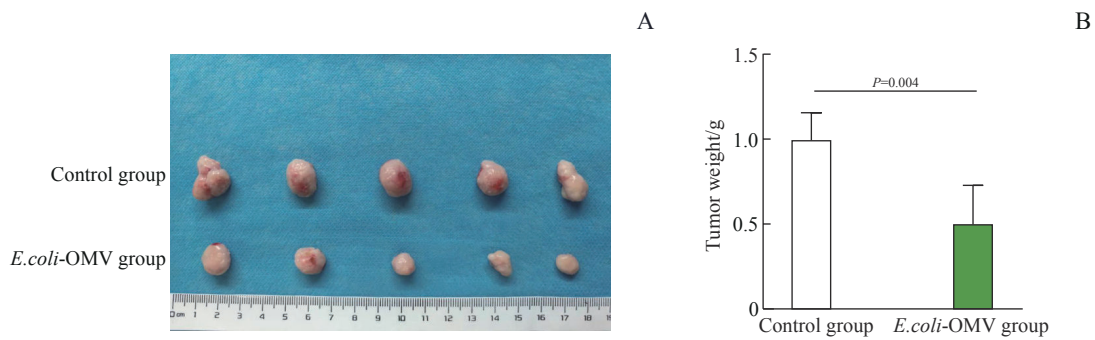
2.5.6 *E.coli*-OMV 对小鼠肿瘤组织病理学变化的影响 H-E 染色的结果 (图 9) 显示, 相较于 Control 组, *E.coli*-OMV 组小鼠肿瘤组织细胞排列松散、紊乱, 病理性细胞核分裂象减少 ($P=0.038$), 核仁染色较浅、不明显。



Note: A. Tumor volume growth curve of the mice injected from 0 d to 20 d. B. Tumor volume growth in mice at d 20 post-injection.

图7 2组BALB/c-4T1荷瘤小鼠的肿瘤体积变化

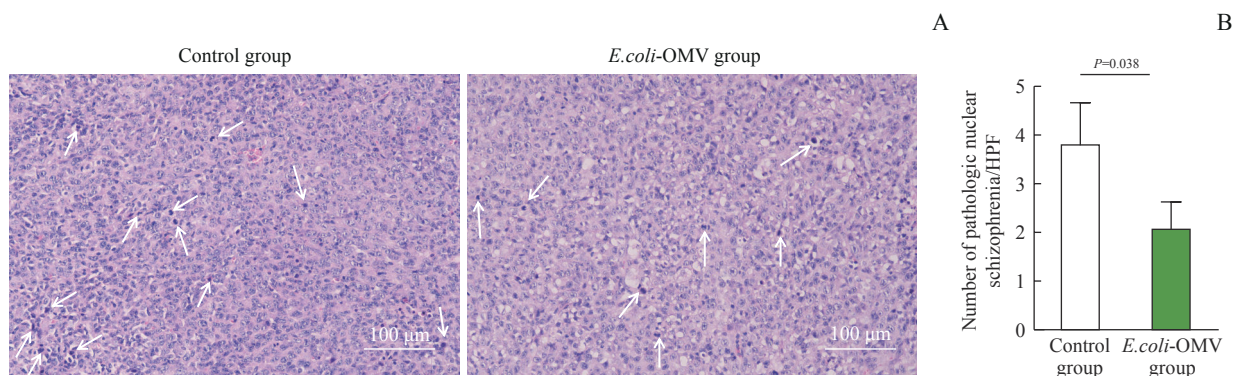
Fig 7 Changes in tumor volume growth of BALB/c-4T1 tumor-bearing mice in the two groups



Note: A. Anatomy picture of tumor tissues in the two groups at 20 d post-injection. B. Statistical analysis of tumor weight in the two groups at 20 d post-injection.

图8 2组BALB/c-4T1荷瘤小鼠的肿瘤质量变化

Fig 8 Changes in tumor weight of BALB/c-4T1 tumor-bearing mice in the two groups



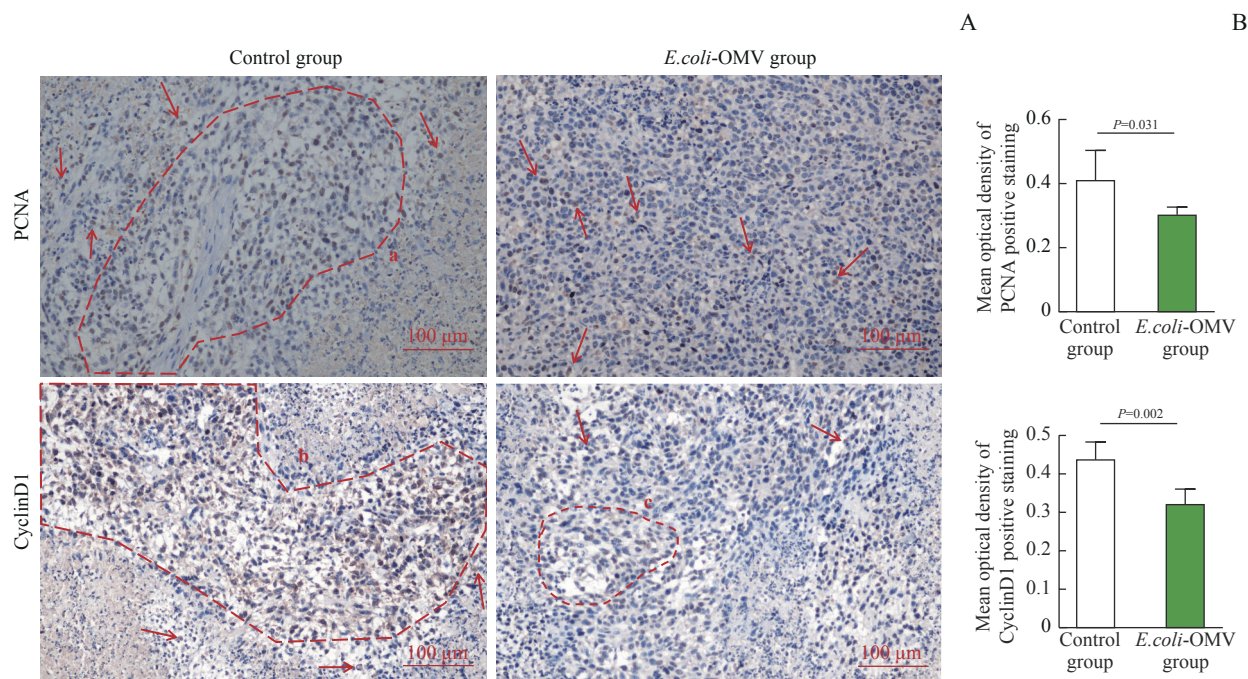
Note: A. H-E staining of tumor tissues. White arrows indicate pathological nuclear schizoporenia. B. Statistical analysis of pathological nuclear schizoporenia of tumor tissues. HPF—High power field.

图9 2组BALB/c-4T1荷瘤小鼠的肿瘤组织的H-E染色分析(×200)

Fig 9 Analysis of H-E staining of tumor tissues of BALB/c-4T1 tumor-bearing mice in the two groups (×200)

2.5.7 *E. coli*-OMV 对小鼠肿瘤组织 PCNA、CyclinD1 蛋白表达的影响 免疫组织化学染色的结果 (图 10) 显示, 2 组小鼠的肿瘤组织均有 PCNA 和 CyclinD1 阳性表达, 且均定位于细胞核, 呈棕黄色;

与 Control 组染色阳性区域相比, *E.coli*-OMV 组小鼠肿瘤组织中 PCNA 和 CyclinD1 阳性表达均减少 ($P=0.031$, $P=0.002$)。



Note: A. Immunohistochemical images of PCNA and CyclinD1 expressions in the two groups. The areas circled by the red dotted line a, b, c are large area of positive expression. Red arrows indicate scattered nuclei with positive expression. B. Statistical analysis of mean optical density of PCNA and CyclinD1 positive staining.

图 10 免疫组织化学染色分析 2 组 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织中 PCNA、CyclinD1 的表达 ($\times 200$)

Fig 10 Analysis of the expression of PCNA and CyclinD1 in tumor tissues of BALB/c-4T1 tumor-bearing mice in the two groups by immunohistochemical staining ($\times 200$)

3 讨论

乳腺癌是女性癌症死亡的主要原因之一。近年来,微生物在乳腺癌治疗方面的应用已取得一定进展。研究表明 *E.coli* 具有天然的肿瘤杀伤能力,能够改善乳腺癌的治疗效果。然而,由于细菌在肿瘤区域内繁殖后会释放大量毒素,从而对机体产生危害,这使得寻求更安全、高效的治疗方法成为了医学界的难题^[15]。

作为细菌的衍生物,OMV 虽不可自我复制,但在功能上与亲本细菌具有一定的相似性。目前,已有研究证明了细菌的抗肿瘤作用,而 OMV 是否具有抗肿瘤功能以及其具体机制尚未得到广泛研究^[16]。

在本研究中,我们通过超滤离心法从 *E.coli* 培养的上清液中获得 *E.coli*-OMV。首先,通过体外实验发现, *E.coli*-OMV 可以抑制小鼠 4T1 乳腺癌细胞的增殖,且抑制效果呈现时间-浓度依赖性;体内实验显示, *E.coli*-OMV 对 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制效果显著,表现为肿瘤体积、质量均有下降,且小鼠 40 d 存活率增加,表明 *E.coli*-OMV 具有良好的抗肿瘤活性。其次,流式细胞术的结果显示, *E.coli*-

OMV 将 4T1 细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期;免疫组织化学染色的结果显示, *E.coli*-OMV 组小鼠肿瘤组织中的 PCNA 和 CyclinD1 表达均有减少,继而提示 *E.coli*-OMV 的抑瘤作用与其对细胞周期的调控作用相关。真核细胞完成正常的有丝分裂需要细胞周期的有序进行,这一过程离不开各种细胞周期蛋白和相关因子的调控。当细胞处于 G_0/G_1 期时,大量表达的 PCNA 可为 DNA 复制做准备^[17],而后 CyclinD 开始表达以保证细胞从 G_0/G_1 期向 S 期的正常转化,进而推进细胞周期循环完成有丝分裂。在此过程中,细胞任一时相的异常都可能导致细胞增殖失调,这是肿瘤发生与无限制增殖恶化的主要原因之一^[18]。因此,恢复细胞周期蛋白和各级调控因子对细胞周期的正常调控,阻断肿瘤细胞增殖是当前抗肿瘤研究的重要策略。在本研究中, *E.coli*-OMV 可使 4T1 细胞周期停滞在 G_0/G_1 期,同时能够抑制增殖相关蛋白 PCNA 和周期相关蛋白 CyclinD1 的过量表达,使得肿瘤细胞的分裂增殖减缓,从而抑制了小鼠肿瘤的生长。

综上所述,本研究证明了 *E.coli* 来源的 OMV 具有良好的抗肿瘤作用,且初步证明其对细胞周期存在抑制作用。该结果有望为基于微生物疗法的临床肿瘤

治疗提供新的思考。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过重庆医科大学医学研究伦理委员会的审核批准(文件号2022160)。所有实验过程均遵照《医学实验动物管理实施细则》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Ethics Committee of Chongqing Medical University, (Approval Letter No.2022160, dated 28/06/2022), and all experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of *Regulations for the Management of Medical Laboratory Animals*.

作者贡献/Authors' Contributions

王澜茜参与了数据采集、数据处理分析、文章撰写,马官荣和姜咏竹参与了数据采集,常秀林参与了文章修改,方廖琼参与了实验设计、实验指导和文章指导,白晋参与实验设计、监督及文章指导。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

WANG Lanxi collected, processed and analyzed the data, and drafted the manuscript. MA Guanrong and JIANG Yongzhu collected data. CHANG Xiulin revised the manuscript. FANG Liaoqiong designed and guided the experiment, and guided the manuscript. BAI Jin participated in experimental design, supervision and paper guidance. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2022-12-08
- Accepted: 2023-06-01
- Published online: 2023-08-30

参 · 考 · 文 · 献

- [1] KATSURA C, OGUNMWONYI I, KANKAM H K, et al. Breast cancer: presentation, investigation and management[J]. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2022, 83(2): 1-7.
- [2] AKRAM M, IQBAL M, DANIYAL M, et al. Awareness and current knowledge of breast cancer[J]. *Biol Res*, 2017, 50(1): 33.
- [3] LIANG S Y, WANG C, SHAO Y C, et al. Recent advances in bacteria-mediated cancer therapy[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 1026248.
- [4] FISUSI F A, AKALA E O. Drug combinations in breast cancer therapy[J]. *Pharm Nanotechnol*, 2019, 7(1): 3-23.
- [5] SONG S, VUAI M S, ZHONG M. The role of bacteria in cancer therapy: enemies in the past, but allies at present[J]. *Infect Agent Cancer*, 2018, 13: 9.
- [6] 王敏, 苏乌云. 治疗癌症的新型武器: 细菌[J]. *世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊)*, 2019, 19(66): 102-103, 105.
WANG M, SU W Y, et al. Bacteria: a new weapon against cancer[J]. *World Latest Medicine Information*, 2019, 19(66): 102-103, 105.
- [7] SEDIGHI M, ZAHEDI BIALVAEI A, HAMBLIN M R, et al. Therapeutic bacteria to combat cancer; current advances, challenges, and opportunities[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(6): 3167-3181.
- [8] KIKUCHI Y, OBANA N, TOYOFUKU M, et al. Diversity of physical properties of bacterial extracellular membrane vesicles revealed through atomic force microscopy phase imaging[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(14): 7950-7959.
- [9] 邱晓涵, 李泳江, 吴军勇, 等. 细菌外膜囊泡: 疾病治疗的新途径[J]. *药理学学报*, 2021, 56(12): 3441-3450.
QIU X H, LI Y J, WU J Y, et al. Bacterial outer membrane vesicles: a new approach to diseases therapy[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2021, 56(12): 3441-3450.
- [10] CHEN Q, BAI H Z, WU W T, et al. Bioengineering bacterial vesicle-coated polymeric nanomedicine for enhanced cancer immunotherapy and metastasis prevention[J]. *Nano Lett*, 2020, 20(1): 11-21.
- [11] CHEN Y, LIU L G, FU H, et al. Comparative proteomic analysis of outer membrane vesicles from *Shigella flexneri* under different culture conditions[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 453(4): 696-702.
- [12] TOYOFUKU M, NOMURA N, EBERL L. Types and origins of bacterial membrane vesicles[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(1): 13-24.
- [13] RUDNICKA M, NOSZCZYŃSKA M, MALICKA M, et al. Outer membrane vesicles as mediators of plant-bacterial interactions[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 902181.
- [14] 胡慧冰, 侯昕宇, 贺牧野, 等. 细菌外膜囊泡包裹的载药纳米粒的制备及其小鼠鼻腔免疫效果评价[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018, 38(2): 155-160.
HU H B, HOU X Y, HE M Y, et al. Preparation of bacterial outer membrane vesicle coated nanoparticle loaded with drug and evaluation of its nasal immune effect in mice[J]. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science)*, 2018, 38(2): 155-160.
- [15] YAGHOUBI A, KHAZAEI M, HASANIAN S, et al. Bacteriotherapy in breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5880.
- [16] FARKAS-HIMSLEY H, CHEUNG R. Bacterial proteinaceous products (bacteriocins) as cytotoxic agents of neoplasia[J]. *Cancer Res*, 1976, 36(10): 3561-3567.
- [17] STRZALKO W, ZIEMIENOWICZ A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation[J]. *Ann Bot*, 2011, 107(7): 1127-1140.
- [18] GOLIAS C H, CHARALABOPOULOS A, CHARALABOPOULOS K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review[J]. *Int J Clin Pract*, 2004, 58(12): 1134-1141.

[本文编辑] 邢宇洋