

慢病毒载体介导 Gag-Caspase-8 诱导三阴性乳腺癌原代细胞凋亡及 S 期阻滞

王敏¹, 李习平², 檀军³, 邱梅⁴, 侯泽宇⁵, 田莹³, 罗鸿莹⁴, 范超文¹, 齐玲⁶, 俞琦¹, 谢薇⁴

(1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第一附属医院急诊科, 贵州 贵阳 550001;

3. 遵义医科大学组织胚胎学教研室, 贵州 遵义 563006; 4. 贵州中医药大学护理学院, 贵州 贵阳 550025;

5. 遵义医科大学附属医院甲乳外科, 贵州 遵义 563099; 6. 贵州中医药大学第一附属医院重症医学科, 贵州 贵阳 550001)

摘要:目的 探讨携 Gag-Caspase-8 慢病毒样颗粒对三阴性乳腺癌原代细胞增殖、迁移、周期和凋亡的影响及作用机制。方法 收集临床人乳腺癌标本 3 例, 通过改良组织块培养法培养人乳腺癌原代细胞, 通过 HE 染色、免疫组化及免疫荧光鉴定所培养的细胞是否为高纯度三阴性人乳腺癌原代细胞; 慢病毒转染构建携 Gag-Caspase-8 慢病毒样颗粒, 细胞分为 PBS 组、Gag-VLPs 组和 Gag-CASP8-VLPs 组。采用 MTT 法评估细胞增殖, 划痕实验检测细胞迁移能力, AO/EB 染色检测细胞凋亡, 流式细胞术分析细胞周期和凋亡, 蛋白质免疫印迹考察凋亡相关蛋白表达。结果 临床肿瘤标本经 HE 染色确定为乳腺癌病理组织, 免疫组化鉴定乳腺癌原代细胞特异性分子标记物 CA153 阳性高表达, 并通过计算阳性细胞比例评估细胞纯度约为 98%, 免疫荧光检测结果显示, HER2、ER、PR 均阴性表达, 证明所培养的细胞为高纯度三阴性人乳腺癌原代细胞; Western blotting 检测发现构建的 Gag-VLPs 和 Gag-CASP8-VLPs 内有慢病毒载体特异性分子标志物 P24 表达, 证明慢病毒样颗粒包装成功。Gag-CASP8-VLPs 干预三阴性人乳腺癌原代细胞 24、48 h 后, 与对照组 PBS 和 Gag-VLPs 相比, 倒置显微镜下观察到细胞皱缩、体积减小、贴壁能力下降且漂浮细胞增多; MTT 检测显示, Gag-CASP8-VLPs 组显著抑制了人乳腺癌原代细胞的生长 ($P < 0.01$), 并呈时间依赖性; 细胞划痕实验观察到, Gag-CASP8-VLPs 组可显著抑制人乳腺癌原代细胞的迁移能力 ($P < 0.05$); 流式细胞术检测发现, Gag-CASP8-VLPs 组 S 期细胞数量显著增高 ($P < 0.01$), 细胞阻滞于 S 期; AO/EB 染色及流式细胞术检测发现, Gag-CASP8-VLPs 组可诱导细胞发生凋亡 ($P < 0.01$); Western blotting 结果显示, Gag-CASP8-VLPs 组三阴性乳腺癌原代细胞内 Gag-Caspase-8、Pro caspase-8、Active caspase-8 和 Caspase-3 凋亡相关蛋白表达显著增高 ($P < 0.01$)。结论 慢病毒介导 Gag-Caspase-8 将活化的 Caspase-8 导入三阴性乳腺癌原代细胞, 通过激活下游 Caspase-3, 诱导细胞凋亡, 并使细胞停滞在 S 期, 从而抑制细胞增殖和迁移。

关键词:慢病毒载体; Gag-Caspase-8; 三阴性人乳腺癌原代细胞; Caspase-8; S 期阻滞

中图分类号: R736.3

文献标志码: A

Lentivirus vector-mediated Gag-Caspase-8 induces apoptosis and S-phase arrest in triple-negative breast cancer primary cells

WANG Min¹, LI Xiping², TAN Jun³, QIU Mei⁴, HOU Zeyu⁵, TIAN Ying³,

LUO Hongying⁴, FAN Chaowen¹, QI Ling⁶, YU Qi¹, XIE Wei⁴

(1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2. Department of Emergency, The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine,

Guiyang 550001, Guizhou, China; 3. Department of Histology and Embryology, Zunyi Medical University, Zunyi 563006,

收稿日期: 2024-10-15

基金项目: 贵州省科技厅基础研究计划(自然科学类)科技基金项目(黔科合基础-ZK[2024]一般403); 贵州中医药大学研究生教育创新计划项目(YCXKYB2023011); 贵州中医药大学研究生科研基金项目(YCXKYS2024008); 贵州中医药大学学术新苗项目(贵科合学术新苗[2023]-04号); 贵州省教育厅高等学校自然科学研究项目(青年科技人才成长项目)(黔教技[2024]120号); 2023年贵州省中医药、民族医药重点学科项目[ZQZYDXK(JS)-2023-02]; 遵义市科技与大数据局联合基金项目(遵市科合HZ字[2023]175号); 贵州省大学生创新训练项目(S2024106621541); 贵州中医药大学护理学院院级项目(HL2406003); 贵州省卫生健康委科技基金项目(gzkwkj2025-347)

通信作者: 俞琦。E-mail: 756128099@qq.com

谢薇。E-mail: 217180455@qq.com

- Guizhou, China; 4. School of Nursing, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China; 5. Department of Thyroid and Breast Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563099, Guizhou, China; 6. Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanisms of Gag-Caspase-8-containing lentivirus-like particles on the proliferation, migration, cell cycle, and apoptosis in primary triple-negative breast cancer (TNBC) cells. **Methods** Three clinical specimens of human breast cancer were collected, and primary cells were cultured using an improved tissue block culture method. The cultured cells were identified as high-purity triple-negative breast cancer primary cells through HE staining, immunohistochemistry, and immunofluorescence. Lentiviral transduction was employed to construct virus-like particles (VLPs) carrying Gag-Caspase-8. The cells were divided into the PBS group, Gag-VLPs group, and Gag-CASP8-VLPs group. Cell proliferation was assessed by MTT assay, cell migration was evaluated by scratch assay, apoptosis was detected by AO/EB staining and flow cytometry, and the expression of apoptosis-related proteins was examined by Western blotting. **Results** Clinical tumor specimens were confirmed as breast cancer tissues by HE staining. Immunohistochemistry revealed high expression of CA153 in the primary breast cancer cells, with a purity of approximately 98% based on the proportion of positive cells. Immunofluorescence analysis showed that HER2, ER, and PR were all negatively expressed, confirming the cultured cells as high-purity triple-negative human breast cancer primary cells. Western blotting detected the expression of the lentiviral vector-specific marker P24 in both Gag-VLPs and Gag-CASP8-VLPs, indicating successful packaging of lentivirus-like particles. Upon intervention with Gag-CASP8-VLPs for 24 and 48 hours, compared to PBS and Gag-VLPs controls, inverted microscopy observed cellular shrinkage, reduced size, decreased adherence, and increased floating cells. MTT assays demonstrated significant inhibition of cell growth in the Gag-CASP8-VLPs group ($P < 0.01$), with time-dependent effects. Wound healing assays showed significant inhibition of cell migration ($P < 0.05$). Flow cytometry revealed a significant increase in S-phase cells ($P < 0.01$), indicating cell cycle arrest at the S phase. AO/EB staining and flow cytometry detected induced apoptosis in the Gag-CASP8-VLPs group ($P < 0.01$). Western blotting results indicated significantly increased expressions of Gag-Caspase-8, Pro caspase-8, Active caspase-8, and Caspase-3 ($P < 0.01$), demonstrating that lentivirus-mediated Gag-Caspase-8 effectively enters and activates downstream apoptotic executioner Caspase-3 in triple-negative human breast cancer primary cells, leading to their apoptosis. **Conclusion** Lentivirus-mediated Gag-Caspase-8 can deliver activated Caspase-8 into primary TNBC cells, induce apoptosis through activation of caspase-3, arrest cells at the S phase, and inhibit cell proliferation and migration.

Key words: Lentiviral vectors; Gag-Caspase-8; Primary triple-negative breast cancer cells; Caspase-8; S phase arrest

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是对于女性最具侵袭性和复杂性的癌症之一^[1-2]。相比雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)或人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)过表达型乳腺癌患者的多种治疗选择,TNBC患者因受体缺失,对内分泌和靶向治疗反应有限,主要依赖化疗与放疗。但TNBC对传统治疗响应低且易耐药,预后较差^[3-4]。因此,开发针对TNBC关键分子靶点的新型基因靶向治疗策略,对改善TNBC患者临床结局至关重要。Caspase-8作为细胞凋亡过程中的核心执行者,在这一领域展现出了巨大的潜力^[5]。Caspase-8通过激活下游的凋亡执行分子(如Caspase-3)来促使细胞启动凋亡过程,并有效地阻滞细胞周期于S期,从而显著抑制肿瘤细胞的增殖与迁移^[6-7]。研究表明,Caspase-8不仅在传统凋亡途径中发挥关键作用,还参与调控坏

死性凋亡与细胞焦亡,其活性与表达水平直接影响多种疾病的发生与发展,为肿瘤治疗及疾病干预提供了新策略与靶点^[6, 8-10]。

病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)为安全、高效的疫苗候选及运输工具,其特性与感染性病毒相似但无致病性^[11]。Essus等^[12]利用噬菌体P22 VLP结合光敏剂治疗乳腺癌取得进展。HIV Gag能自发形成VLPs,且Gag-VLP经VSV-G伪型可增强免疫原性^[13]。本课题组已成功构建了一种Gag-CASP8融合蛋白,该蛋白能在HIV蛋白酶的存在下形成成熟的VLPs,这些VLPs含有活化的CASP8蛋白^[14-15]。并且本课题组的前期研究已证实,经过VSV-G伪型修饰的CASP8-VLPs能够高效穿透乳腺癌细胞并诱导其凋亡。此外,在4T1小鼠乳腺癌模型中,通过直接向肿瘤部位注射Gag-CASP8-VLPs,可以显著抑制肿瘤的生长^[15]。

针对TNBC当前治疗手段主要是依赖化疗和

放疗,但这些方法响应率低且易产生耐药性。因此,开发更有效的治疗策略至关重要。Caspase-8 作为细胞凋亡的关键执行者,在抑制肿瘤细胞增殖与迁移方面展现出巨大潜力,但其在 TNBC 中的具体激活机制仍需深入研究。尽管 VLPs 作为一种安全高效的运输工具已被广泛认可,其在 TNBC 治疗中的应用尚处于研究阶段,需进一步验证 Gag-CASP8-VLPs 的安全性和长期疗效,并优化设计以增强靶向性和治疗效果。本研究通过构建和优化 Gag-CASP8 融合蛋白形成的 VLPs,旨在通过 Caspase-8 介导的细胞凋亡途径,为 TNBC 提供一种新的基因靶向治疗手段,改善患者预后。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 TNBC 原代细胞

细胞取自 2023 年 9 月至 2024 年 9 月于遵义医科大学附属医院、贵州中医药大学第一附属医院甲状腺乳腺外科住院、且明确病理诊断为 TNBC 的女性患者。标本共 3 例,患者年龄 28~48 岁,平均 38 岁。本研究已获得贵州中医药大学第一附属医院伦理委员会的伦理审查与批准(伦理审批号:KS2023295)。所有实验均按照相关伦理委员会的指导原则进行。对于涉及人类受试者的部分,术前获得患者知情同意并签署同意书。

1.1.2 材料

慢病毒包装的 3 种质粒($\Delta 8.2$ 、VSVG、Lent-Gag-Caspase-8)由加拿大曼尼托巴大学敖竹君博士馈赠。CA153 兔多克隆抗体、兔抗人 Caspase-8 购自美国 Proteintech Group 生物公司,鼠抗人 P24 购自英国 Abcam 试剂公司,Anti-caspase-3 antibody 购自英国 Abcam 试剂公司,Goat Anti-Mouse IgG H&L Horseradish Peroxidase(HRP) 购自英国 Abcam 试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 改良组织块法培养 TNBC 原代细胞及鉴定

将明确诊断为 TNBC 组织及其癌旁组织标本分别均等分割为两部分。其中一部分标本进行 HE 染色处理,以进一步确认其病理诊断;而另一部分标本则被放置于生物安全柜中,采用改良组织块培养法培养人乳腺癌原代细胞,并通过一次性胰酶消化时间差法进行纯化。使用免疫组化法检测 CA153 阳性表达,以鉴定细胞并通过计算阳性细胞比例评估纯度;利用免疫荧光检测 ER、PR 或 HER2 的表达,确定细胞亚型。将 TNBC 原代细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下培养,选择 5 代以内对数生长期的细胞

进行实验^[16]。

1.2.2 制备鉴定慢病样颗粒

1.2.2.1 质粒

在 SVCMV-Gag-Pol 质粒中,用 PCR 扩增的全长人 CASP8 cDNA 替换 HIV Pol 基因,构建表达质粒的 pSVCMVGag-CASP8 融合蛋白^[14]。介于 Gag 和 CASP8 之间插入 HIV-1 蛋白酶裂解位点(SQNY/PIV)。用于辅助包装的 pCMV- $\Delta 8.2$ 构建和囊性口炎病毒 G 糖蛋白(vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSVG)表达质粒的制备方法参考文献^[17]。同时,用于产生稳定细胞系的 HIV-1 反转录酶、整合酶及包膜蛋白三重缺陷型前病毒质粒($\Delta RI/E-/Gluc+$)的构建方法参考文献^[14]。

1.2.2.2 转染和制备 VLP

用 Lent-Gag-Caspase-8、 $\Delta 8.2$ 和 VSVG 通过 PEI 共转染入 293T 细胞后收集的慢病毒样颗粒,即为 Gag-CASP8-VLPs;用 $\Delta 8.2$ 和 VSVG 通过 PEI 共转染入 293T 细胞后收集的慢病毒样颗粒,即为 Gag-VLPs。

1.2.2.3 鉴定 VLP

采用 Western blotting 检测包装好的慢病毒样颗粒,检测病毒标志蛋白 P24 的表达。

1.2.3 慢病毒样颗粒感染 TNBC 原代细胞

本研究设立 3 个组:空白对照组(磷酸盐缓冲液处理,PBS 组)、空载体对照组(仅含 Gag 蛋白的病毒样颗粒,Gag-VLPs 组),以及实验组(携带 Gag-CASP8 融合蛋白的慢病毒样颗粒,Gag-CASP8-VLPs 组)。根据 1.2.2.3 所得到的 P24 蛋白条带灰度值,调整 Gag-VLPs 组和 Gag-CASP8-VLPs 组慢病毒样颗粒为相同浓度。感染前,将第 5 代 TNBC 原代细胞以 2×10^4 /mL 的浓度接种到 96 孔板或 6 孔板中,培养 24 h 后,将 PBS、Gag-VLPs 或 Gag-CASP8-VLPs 按照与培养基 1:10 的体积比分别加入接种细胞的 96 孔板或 6 孔板中,与靶细胞共孵育。在作用 24、48 h 后,检测三阴性人乳腺癌原代细胞存活率、迁移率、细胞周期、凋亡率及凋亡相关蛋白的表达。

1.2.3.1 MTT 法检测细胞增殖活性

加入等量的 Gag-CASP8-VLPs、Gag-VLPs 或者 PBS 处理 96 孔板中培养的 TNBC 原代细胞,24 h 及 48 h 后评估细胞活性。先将 MTT 以 DMEM+10% FBS 稀释至 0.5 mg/mL,替换原培养液,37℃、5% CO₂ 下培养 3~5 h 至结晶形成。吸去培养液,加 150 μ L DMSO 溶晶,轻摇 5 min。酶标仪测 OD₅₇₀,重复实验 3 次。

1.2.3.2 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

加入等量的 Gag-CASP8-VLPs、Gag-VLPs 或者

PBS 处理 6 孔板中培养的 TNBC 原代细胞,24 h 后,收集 6 孔板细胞,用 200 μL 枪头划线。清洗后,加 1% FBS 培养基为对照,加含 Gag-CASP8-VLPs 的 1%FBS 为处理组,每组双孔。混匀后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 中培养。

1.2.3.3 流式细胞术检测细胞周期

加入等量的 Gag-CASP8-VLPs 或者 Gag-VLPs 处理 96 孔板中培养的 TNBC 原代细胞,48 h 后用 0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,用 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 洗涤,单细胞悬液离心,800 $\times g$ 离心 5 min,弃上清;PBS 1 mL 离心,弃上清;70%酒精 2 mL,4 $^{\circ}\text{C}$,30 min,离心,弃上清液;PBS 1 mL 离心,弃上清;RNase A 的 PBS 溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$),500 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$,30 min,离心弃上清;PBS 1 mL 离心,弃上清;PI 的 PBS 溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),500 μL ,室温避光孵育 30 min;吹打混匀,300 目筛网过滤至流式管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,检测。

1.2.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡

加入等量的 Gag-CASP8-VLPs、Gag-VLPs 或者 PBS 处理 96 孔板培养的 TNBC 原代细胞,48 h 后,将 AO/EB 染料混合物 (10 μL) 加入每个孔中,在倒置荧光显微镜下观察细胞 ($\times 200$)。加入等量的 Gag-CASP8-VLPs 或者 Gag-VLPs 处理 96 孔板中培养的 TNBC 原代细胞,48 h 后用 0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,用 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 洗涤,用 1 mL 1 \times Binding Buffer 悬浮细胞,800 $\times g$ 离心 5 min,弃上清;每管加入 100 μL 1 \times Binding Buffer;再向管中加入 5 μL Annexin V-FITC;室温,轻轻混匀,避光,孵育 10 min;加入 5 μL PI,室温,避光,孵育 5 min;加入 PBS 至 500 μL ,轻轻混匀;1 h 内用流式细胞仪检测^[18]。

1.2.3.5 免疫印迹检测蛋白表达

感染 24 h 后,收集不同组的 TNBC 原代细胞,使用 RIPA 裂解缓冲液 (140 mmol/L NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% 去氧胆酸钠, 0.05% SDS, pH 7.2) 裂解,随后直接进行 12% SDS-PAGE 电泳。用抗 CASP8 和抗 Caspase-3 抗体检测 CASP8 和 Caspase-3。最后用 ECL 系统进行曝光测定目标蛋白。

1.3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计处理,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差和 t 检验分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养 TNBC 原代细胞

镜下可见乳腺癌组织细胞形态多样化,排列紊乱,呈巢状或岛屿状在间质中浸润性生长,未见明显的小叶间导管和腺泡,脂肪组织较少;癌旁组织中可见脂肪组织间夹有单层柱状上皮组成的小叶间导管和腺泡(图 1)。对贴壁组织块培养 5 d 即可对组织块周围爬出的原代细胞进行纯化,纯化后细胞生长迅速(图 2)。乳腺癌原代细胞内均可见棕色信号,细胞轮廓清晰,CA153 (MUC1) 在所培养的乳腺癌细胞中呈阳性表达,且阳性细胞比例约为 98%,而人乳腺癌癌旁原代细胞未见此信号表达(图 3);培养的乳腺癌原代细胞内 ER、PR、HER2 均为阴性(图 4)。

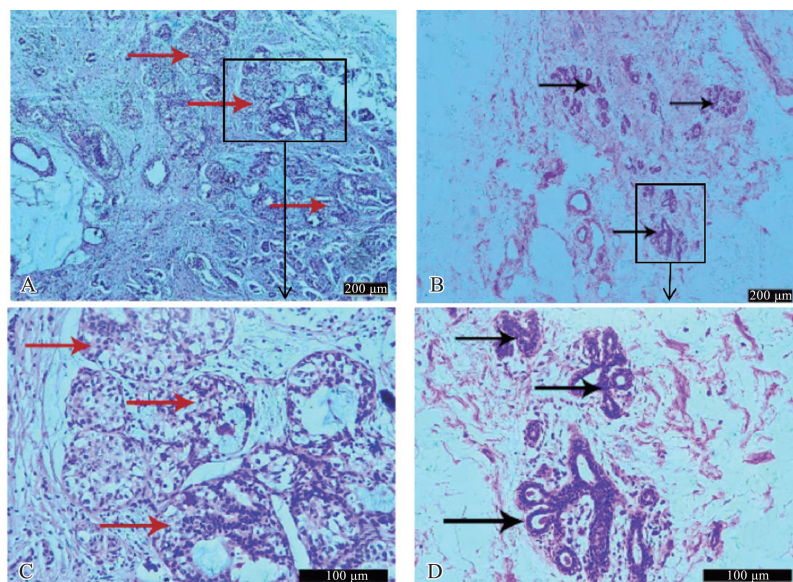


图 1 乳腺癌和癌旁组织 HE 染色结果

A: 乳腺癌组织 ($\times 100$); B: 乳腺癌旁组织 ($\times 100$); C: 乳腺癌组织 ($\times 400$); D: 乳腺癌旁组织 ($\times 400$)。

Figure 1 HE staining results of breast cancer and adjacent tissues

A: Breast cancer tissue ($\times 100$); B: Adjacent non-tumor tissue ($\times 100$); C: Breast cancer tissue ($\times 400$); D: Adjacent non-tumor tissue ($\times 400$).

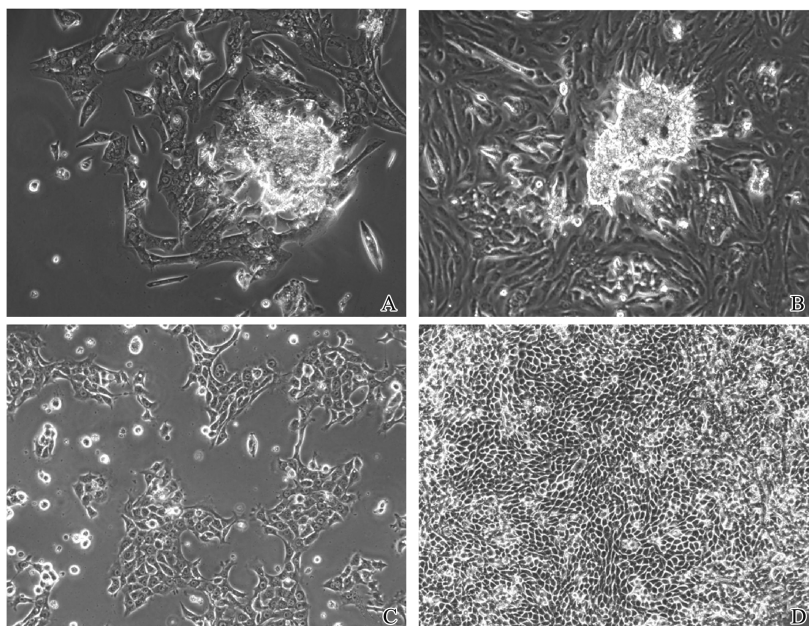


图 2 改良组织块培养法(×100)

A:组织块培养法第 3 天所见;B:组织块培养法第 5 天所见;C:用一次性胰酶消化时间差法纯化后培养第 2 天;D:用一次性胰酶消化时间差法纯化后培养第 5 天。

Figure 2 Improved tissue block culture method (×100)

A: Day 3 of tissue block culture; B: Day 5 of tissue block culture; C: Day 2 post-purification using single-step trypsin digestion; D: Day 5 post-purification using single-step trypsin digestion.

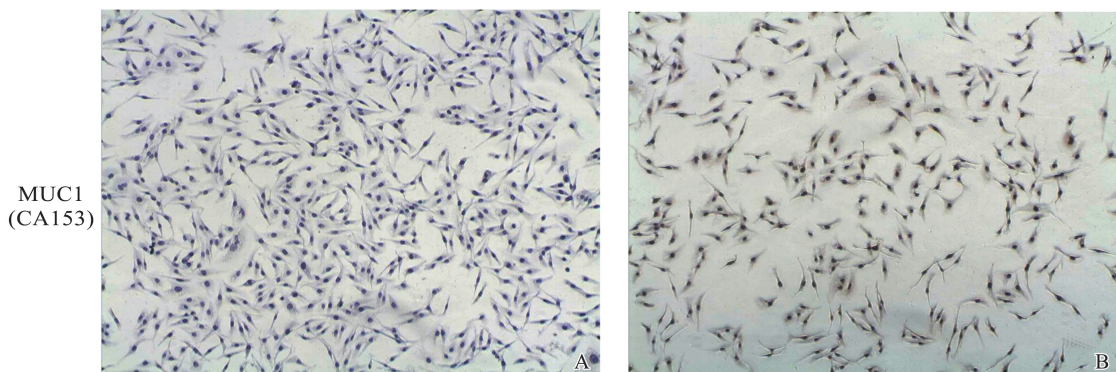
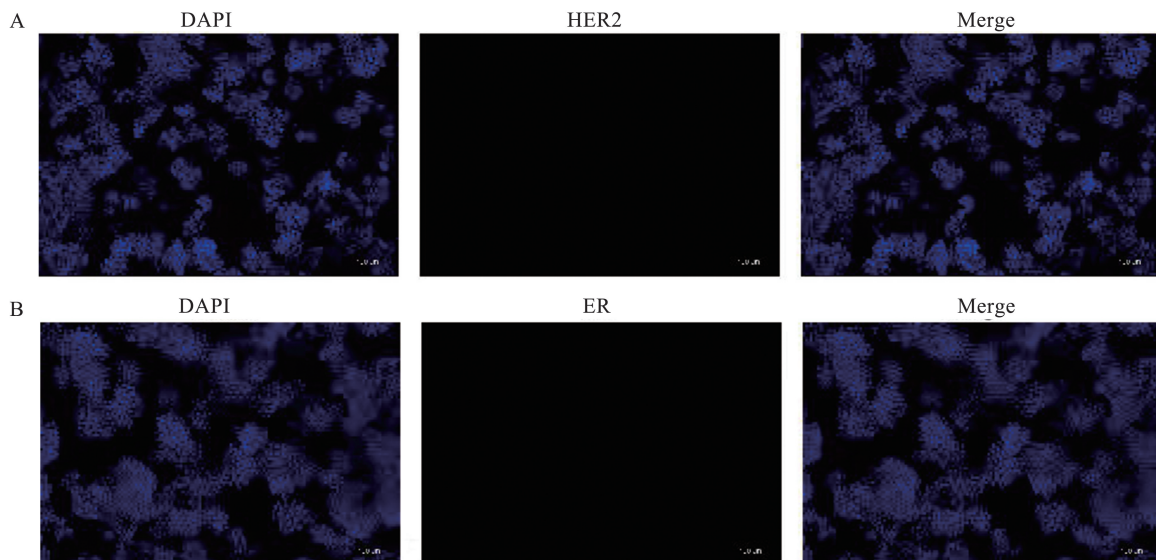


图 3 乳腺癌(A)和癌旁原代细胞(B)免疫组化鉴定结果(×100)

Figure 3 Immunohistochemical identification results of breast cancer (A) and adjacent tissue primary cells (B)



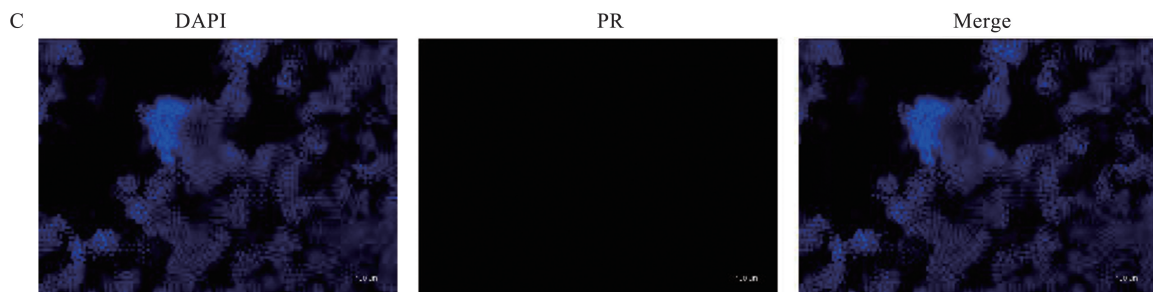


图4 免疫荧光鉴定 TNBC 原代细胞($\times 100$)

A: HER2; B: ER; C: PR。

Figure 4 Immunofluorescence identification of TNBC primary cells ($\times 100$)

A: HER2; B: ER; C: PR.

2.2 Western blotting 鉴定慢病毒样颗粒包装成功

Western blotting 结果显示, Gag-CASP8-VLPs 组和 Gag-VLPs 组均有病毒标志性 P24 蛋白表达, 证明慢病毒样颗粒包装成功(图 5)。

2.3 Gag-CASP8-VLPs 对 TNBC 原代细胞增殖抑制的作用

TNBC 原代细胞形态图显示, Gag-CASP8-VLPs 作用 24 h 后, Gag-CASP8-VLPs 组细胞皱缩、体积减小, 贴壁能力减弱, 漂浮细胞增多。PBS 组和 Gag-VLPs 组细胞则保持饱满圆形, 贴壁良好,

轮廓清晰(图 6)。

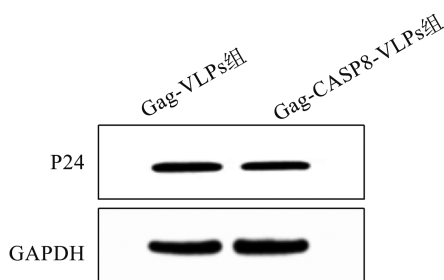


图5 慢病毒样颗粒中 P24 蛋白表达

Figure 5 Expression of P24 protein in lentivirus-like particles

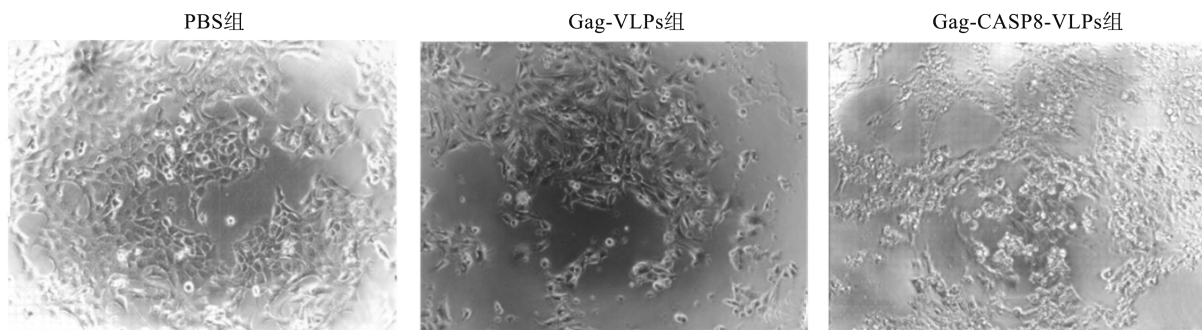


图6 Gag-CASP8-VLPs 处理 24 h 后 TNBC 原代细胞的形态变化($\times 100$)

Figure 6 Morphological changes in TNBC primary cells after 24 h treatment with Gag-CASP8-VLPs ($\times 100$)

MTT 检测结果显示, Gag-CASP8-VLPs 处理的 TNBC 原代细胞 24 h 和 48 h 存活率分别为 (0.82 ± 0.04) 和 (0.55 ± 0.03) , Gag-VLPs 组在 24 h 和 48 h 的细胞存活率分别为 (0.91 ± 0.05) 和 (0.89 ± 0.01) , PBS 组在 24 h 和 48 h 的细胞存活率为 (1.00 ± 0.00) 和 (1.00 ± 0.00) 。与对照 PBS 组与 Gag-VLPs 组相比, Gag-CASP8-VLPs 显著抑制了 TNBC 原代细胞增殖(P 均 < 0.01), 且 48 h 的细胞存活率显著低于 24 h(P 均 < 0.01)。

2.4 Gag-CASP8-VLPs 对 TNBC 原代细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果表明, 在 Gag-CASP8-VLPs

作用 24 h 后, PBS 组、Gag-VLPs 组和 Gag-CASP8-VLPs 组的 TNBC 原代细胞迁移率分别为 $(46.63 \pm 4.90)\%$ 、 $(45.92 \pm 4.86)\%$ 和 $(21.34 \pm 4.11)\%$ 。与 PBS 组和 Gag-VLPs 组相比, Gag-CASP8-VLPs 组的迁移距离显著减少($P < 0.05$)(图 7)。

2.5 Gag-CASP8-VLPs 对三阴性人乳腺癌原代细胞周期的影响

流式细胞术结果显示, Gag-CASP8-VLPs 感染 TNBC 原代细胞 24 h 后, Gag-CASP8-VLPs 组 S 期细胞数量占比 [$(30.55 \pm 0.29)\%$] 均明显高于 Gag-VLPs 组 [$(24.47 \pm 0.10)\%$] 和 PBS 组 [$(19.97 \pm 0.12)\%$], 差异有统计学意义(P 均 < 0.01)(图 8)。

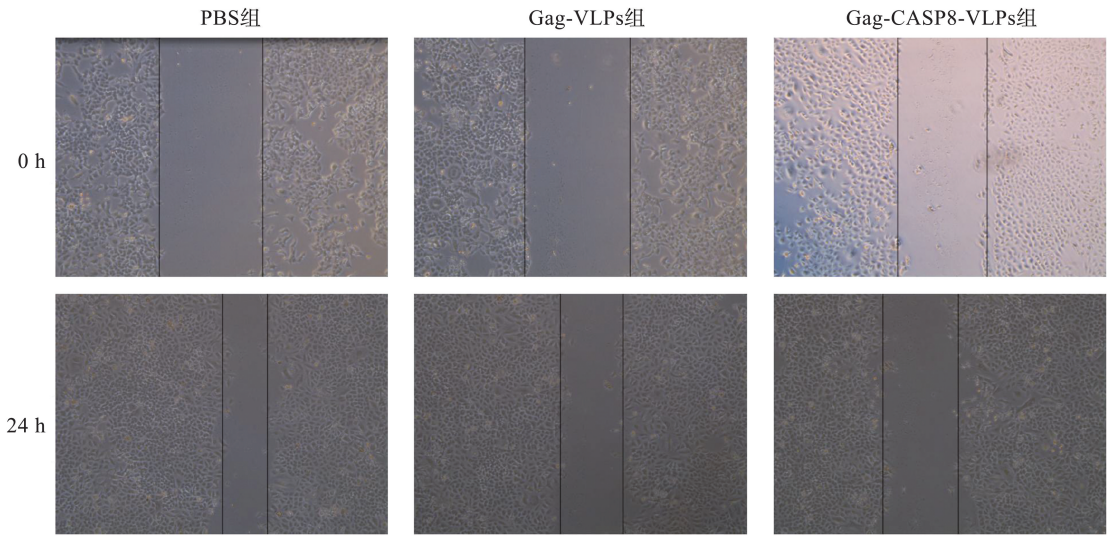


图7 Gag-CASP8-VLPs 作用 0 h 和 24 h 对 TNBC 原代细胞迁移影响的形态图(×100)

Figure 7 Morphological changes in TNBC primary cells at 0 h and 24 h post-treatment with Gag-CASP8-VLPs (×100)

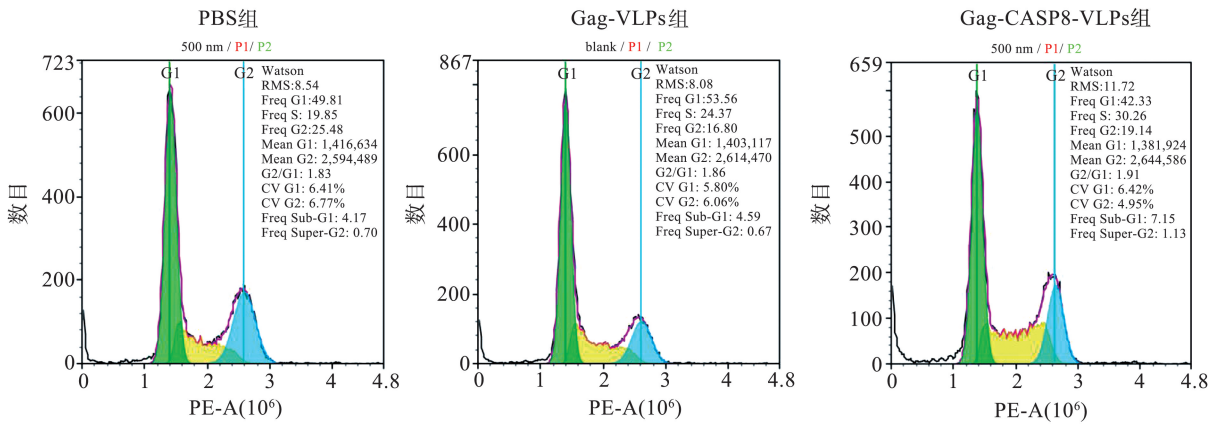


图8 Gag-CASP8-VLPs 作用 24 h 对 TNBC 原代细胞周期的影响

Figure 8 Effect of Gag-CASP8-VLPs on the cell cycle of TNBC primary cells after 24 h treatment

2.6 Gag-CASP8-VLPs 对 TNBC 原代细胞凋亡的影响

2.6.1 AO-EB 染色检测细胞凋亡

Gag-CASP8-VLPs 作用 TNBC 原代细胞 24 h

后,AO/EB 双染色结果显示,PBS 组和 Gag-VLPs 组细胞核为绿色。Gag-CASP8-VLPs 组部分细胞核呈现黄绿色或黄色;而一些细胞则显示为橘红色(图9)。

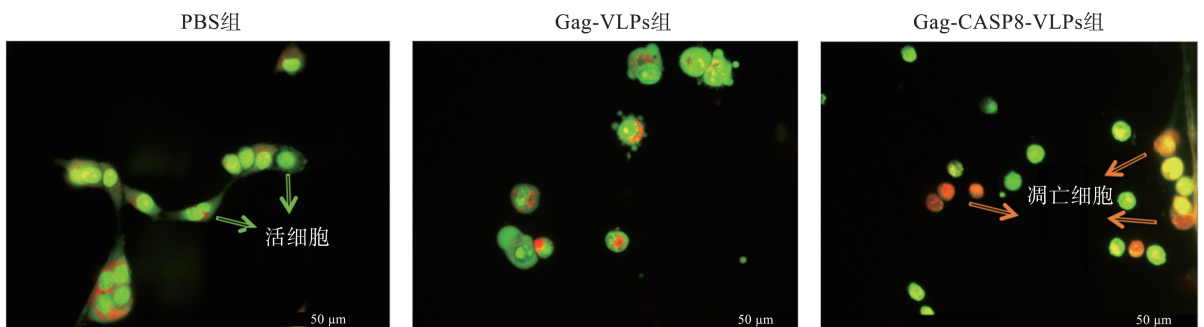


图9 Gag-CASP8-VLPs 作用 24 h 对 TNBC 原代细胞凋亡的影响(×400)

Figure 9 Effect of Gag-CASP8-VLPs action for 24 h on apoptosis in TNBC primary cells (×400)

2.6.2 流式细胞术检测细胞凋亡

流式细胞术结果显示,PBS 组、Gag-VLPs 组和

Gag-CASP8-VLPs 组处理 TNBC 原代细胞 24 h 后的凋亡率分别为 $(0.03 \pm 0.00)\%$ 、 $(20.03 \pm 2.26)\%$ 和

(62.33 ± 0.63)%, PBS 组和 Gag-VLPs 组细胞凋亡率显著低于 Gag-CASP8-VLPs 组 ($P < 0.01$) (图 10)。

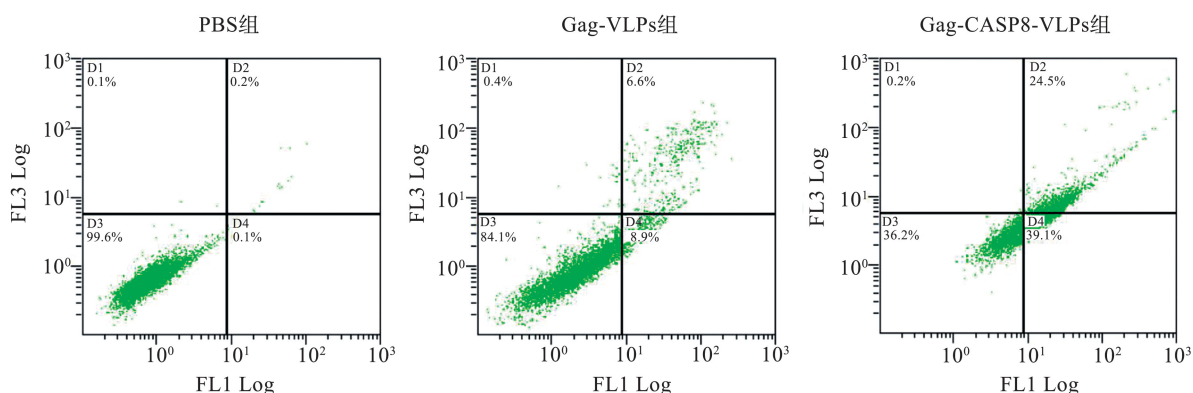


图 10 Gag-CASP8-VLPs 作用 24 h 对 TNBC 原代细胞凋亡的影响

Figure 10 Effect of Gag-CASP8-VLPs on apoptosis in TNBC primary cells after 24 h treatment

2.7 Gag-CASP8-VLPs 对 TNBC 原代细胞凋亡相关蛋白表达的影响

慢病毒样颗粒感染 TNBC 原代细胞 24 h 后, Western blotting 结果显示, Gag-CASP8-VLPs 组大量表达凋亡相关蛋白, Gag-VLPs 组和 PBS 组有少量凋亡相关蛋白表达(图 11)。

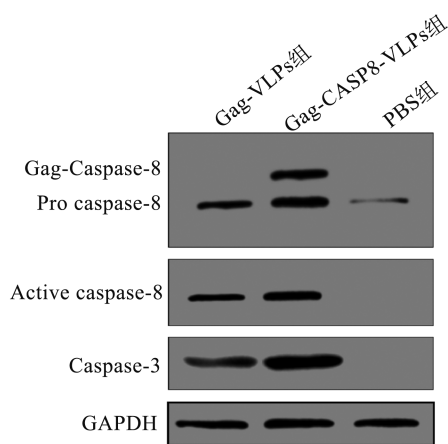


图 11 慢病毒样颗粒感染 TNBC 原代细胞内相关凋亡蛋白的表达

Figure 11 Expression of apoptosis-related proteins in TNBC primary cells infected with lentivirus-like particles

进一步利用灰度值分析发现, Gag-CASP8-VLPs 组中 Gag-Caspase-8、Pro caspase-8、Active caspase-8、Caspase-3 蛋白灰度值分别为 $10\ 723.33 \pm 867.39$ 、 $19\ 458.00 \pm 786.19$ 、 $12\ 812.33 \pm 520.43$ 、 $5\ 986.35 \pm 123.91$, Gag-VLPs 组中 Gag-Caspase-8、Pro caspase-8、Active caspase-8、Caspase-3 蛋白灰度值分别为 0.00 ± 0.00 、 $5\ 010.33 \pm 564.20$ 、 $3\ 821.67 \pm 307.13$ 、 $1\ 097.31 \pm 48.64$, PBS 组中 Gag-Caspase-8、Pro caspase-8、Active caspase-8、Caspase-3 蛋白灰度值分别为 0.00 ± 0.00 、 $2\ 971.67 \pm 507.49$ 、 $1\ 588.33 \pm 209.42$ 、 0.00 ± 0.00 , Gag-CASP8-VLPs 组中相关数据均明显高于 Gag-VLPs

组和 PBS 组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01)。

3 讨论

本研究利用慢病毒载体技术, 将 Gag-Caspase-8 精准递送至 TNBC 原代细胞内, 并观察到了显著的抗肿瘤效应。与 Gag-VLPs 组和 PBS 组相比, MTT 实验结果显示, Gag-CASP8-VLPs 能够显著抑制 TNBC 原代细胞增殖, 并且随着时间延长, 抑制效果更明显; 细胞划痕实验显示, Gag-CASP8-VLPs 组的迁移距离显著减少, 进一步表明 Gag-CASP8-VLPs 显著抑制了 TNBC 原代细胞的划痕愈合能力, 提示其不仅抑制了细胞增殖, 还降低了细胞的迁移能力; 流式细胞术分析显示, 在 Gag-CASP8-VLPs 处理下, TNBC 原代细胞中 S 期细胞的比例显著增高, 这一现象可能与 Gag-CASP8-VLPs 引起的 DNA 复制不完全或 DNA 损伤修复能力下降有关。这些因素导致大多数细胞无法完成 DNA 合成并进入分裂期, 从而停滞在 S 期, 抑制了细胞的增殖和迁移。AO/EB 染色及流式细胞术检测发现, Gag-CASP8-VLPs 组凋亡细胞数显著高于 Gag-VLPs 组和 PBS 组, 说明 Gag-CASP8-VLPs 可诱导 TNBC 原代细胞凋亡, 这一发现不仅揭示了 Gag-CASP8-VLPs 在 TNBC 细胞中触发程序性细胞死亡的能力, 同时也引发了对于其具体作用机制的深入思考。

本研究所建立的携 CASP8 的慢病毒样颗粒可直接将活化的 CASP8 导入肿瘤细胞内。因为在表达质粒 Gag-CASP8 中, HIV-1 蛋白酶裂解位点 (SQNY/PIV) 被插入到 Gag 和 CASP8 之间, CASP8 蛋白通过 HIV 蛋白酶的裂解从 Gag-CASP8 融合蛋白中有效释放, 并组装成 CASP8-VLPs。本研究观察到 VLPs 中 CASP8 蛋白大部分处于活化状态, 能

诱导细胞凋亡。与此类似,之前的研究也表明,FasL 的刺激可能通过多种不同的机制导致 CASP8 的活化^[19-22]。Caspases-3 是细胞凋亡家族中凋亡启动因子 CASP8 下游的凋亡执行分子,本研究发现,Gag-CASP8-VLPs 组 TNBC 原代细胞内凋亡执行分子 Caspases-3 表达量明显高于 Gag-VLPs 组和 PBS 组,说明活化的 CASP8 通过激活其下游凋亡执行分子 Caspases-3 引发肿瘤细胞凋亡^[23]。前期研究表明,CASP8 的激活除 Fas-1 刺激外,还可能通过多种不同的机制发生。在某些生理条件下,CASP8 前体蛋白的大量表达也可能导致自寡聚化,并在没有任何外部凋亡信号的情况下导致自切割和激活^[24]。这些实验数据清晰地揭示了 Gag-Caspase-8 的双重作用机制:一方面,它能够有效激活死亡受体信号通路下游凋亡执行分子——Caspase-3,进而强力诱导肿瘤细胞的程序性死亡;另一方面,Gag-Caspase-8 还能促使肿瘤细胞周期发生特异性阻滞,使之停留在 S 期,从而有效遏制了肿瘤细胞的异常增殖与迁移。

相较于以往的研究,本研究创新性地利用慢病毒载体,包装了载促凋亡蛋白 CASP8 的慢病毒样颗粒(Gag-CASP8-VLPs),能够通过 HIV Gag-CASP8 融合蛋白组装,并且通过 VSV-G 糖蛋白的伪型,实现了将活化的 Gag-Caspase-8 蛋白直接导入三阴性乳腺癌原代细胞;与一般慢病毒载体系统相比,Gag-CASP8-VLP 不包含任何病毒基因组物质,导入的直接是活化的 CASP8。因此,这消除了病毒基因组整合进入宿主染色体的潜在风险^[15]。

本研究存在局限性。首先,使用原代细胞系虽然提高了生理相关性,但增加了操作复杂性和细胞异质性,可能影响结果的一致性和可重复性。未来需优化培养条件、引入更多细胞系,并构建人源化 PDX 模型以增强实验设计的严谨性和普遍适用性。其次,为了更精确地揭示 Gag-Caspase-8 的作用机理及其潜在靶点,可结合单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)和蛋白质组学等先进技术,全面解析其表达模式和相互作用网络。通过识别关键信号通路和分子,结合多维度数据分析,特别是针对 TNBC 的高度异质性,推进个性化医疗方案设计,并基于对 Gag-Caspase-8 功能的理解和技术进步,旨在提供新型且高效的抗肿瘤治疗策略。

综上所述,本研究结果表明,Gag-CASP8-VLPs 能够有效感染 TNBC 原代细胞,并成功将外源性 Caspase-8 蛋白导入肿瘤细胞内;Gag-CASP8-VLPs 处理后,TNBC 原代细胞显著停滞在 S 期,这导致细胞周期的特异性阻滞,从而有效抑制了肿瘤细胞的

增殖和迁移;Gag-CASP8-VLPs 携带的外源性 Caspase-8 蛋白能够激活下游凋亡执行分子 Caspase-3,进而诱导肿瘤细胞的程序性死亡。

参考文献:

- [1] Xiong N, Wu H, Yu Z. Advancements and challenges in triple-negative breast cancer: a comprehensive review of therapeutic and diagnostic strategies [J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1405491. doi:10.3389/fonc.2024.1405491.
- [2] Tran J, Thaper A, Lopetegui-Lia N, et al. Locoregional recurrence in triple negative breast cancer: past, present, and future [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2023, 23 (10): 1085-1093.
- [3] Hossain F, Majumder S, David J, et al. Precision medicine and triple-negative breast cancer: current landscape and future directions [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13 (15): 3739. doi:10.3390/cancers13153739.
- [4] 王喆,刘玉洁,毛倩,等.基于逆概率加权法的早期三阴性乳腺癌不同治疗方案的疗效评价[J].*山东大学学报(医学版)*, 2021, 59(8): 113-118.
WANG Zhe, LIU Yujie, MAO Qian, et al. Evaluation of the efficacy of different regimens for early triple negative breast cancer based on the inverse probability of treatment weighting method [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2021, 59(8): 113-118.
- [5] Tian S, Wang Z, Wu Z, et al. Valtrate from *Valeriana jatamansi* Jones induces apoptosis and inhibits migration of human breast cancer cells *in vitro* [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(18): 2660-2663.
- [6] Jia Y, Tian Y, An S, et al. Effects of microRNA-195 on the prognosis of glioma patients and the proliferation and apoptosis of human glioma cells [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 753-763.
- [7] Derakhshani A, Silvestris N, Hajiasgharzadeh K, et al. Expression and characterization of a novel recombinant cytotoxin II from *Naja naja oxiana* venom: a potential treatment for breast cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 162: 1283-1292. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.130.
- [8] Mandal R, Barrón JC, Kostova I, et al. Caspase-8: the double-edged sword [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(2): 188357. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188357.
- [9] Tsuchiya K. Inflammasome-associated cell death: pyroptosis, apoptosis, and physiological implications [J]. *Microbiol Immunol*, 2020, 64(4): 252-269.
- [10] Schwarzer R, Laurien L, Pasparakis M. New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8

- [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2020, 63: 186-193. doi:10.1016/j.ceb.2020.02.004.
- [11] Martins SA, Santos J, Silva R, et al. How promising are HIV-1-based virus-like particles for medical applications [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 997875. doi:10.3389/fcimb.2022.997875.
- [12] Essus VA, Souza JG, Nunes G, et al. Bacteriophage P22 capsid as a pluripotent nanotechnology tool [J]. *Viruses*, 2023, 15(2). doi:10.3390/v15020516.
- [13] Tumban E. Bacteriophage virus-like particles: platforms for vaccine design [J]. *Methods Mol Biol*, 2024, 2738: 411-423. doi:10.1007/978-1-0716-3549-0_24.
- [14] Ao Z, Huang J, Tan X, et al. Characterization of the single cycle replication of HIV-1 expressing *Gaussia luciferase* in human PBMCs, macrophages, and in CD4(+) T cell-grafted nude mouse [J]. *J Virol Methods*, 2016, 228: 95-102. doi:10.1016/j.jviromet.2015.11.019.
- [15] Ao Z, Chen W, Tan J, et al. Lentivirus-based virus-like particles mediate delivery of Caspase 8 into breast cancer cells and inhibit tumor growth [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2019, 34(1): 33-41.
- [16] 王敏,陆祥,曾峰,等.人乳腺癌原代细胞组织块培养方法的改良及其鉴定 [J]. *遵义医学院学报*, 2019, 42(4): 448-454.
WANG Min, LU Xiang, ZENG Feng, et al. Improvement and characterization of the primary cell culture of human breast cancer tissue block [J]. *Journal of Zunyi Medical University*, 2019, 42(4): 448-454.
- [17] Kobinger GP, Weiner DJ, Yu QC, et al. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(3): 225-230.
- [18] Hao J, Ding XL, Yang X, et al. *Prunella vulgaris* polysaccharide inhibits growth and migration of breast carcinoma-associated fibroblasts by suppressing expression of basic fibroblast growth factor [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(4): 270-276.
- [19] Yu S, Ji H, Dong X, et al. FAS/FAS-L-mediated apoptosis and autophagy of SPC-A-1 cells induced by water-soluble polysaccharide from *Polygala tenuifolia* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 150: 449-458. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.010.
- [20] Tummers B, Mari L, Guy CS, et al. Caspase-8-dependent inflammatory responses are controlled by its adaptor, FADD, and necroptosis [J]. *Immunity*, 2020, 52(6): 994-1006.
- [21] Zhao T, Li W, Chen J, et al. Genomic variants in Fas-mediated apoptosis pathway predict a poor response to platinum-based chemotherapy for Chinese gastric cancer patients [J]. *J Cancer*, 2021, 12(3): 849-859.
- [22] Sun H, Yang Y, Gu M, et al. The role of Fas-FasL-FADD signaling pathway in arsenic-mediated neuronal apoptosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicol Lett*, 2022, 356: 143-150.
- [23] 封海岗,刘国文,曹洪.干扰 *MAD2L1* 基因表达对乳腺癌细胞凋亡的影响及机制 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2022, 60(10): 9-16.
FENG Haigang, LIU Guowen, CAO Hong, et al. Effects and mechanism of interfering *MAD2L1* gene expression on the apoptosis of breast cancer cells [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2022, 60(10): 9-16.
- [24] 王敏,李习平,杨梅,等. Caspase 信号途径及其在乳腺癌治疗中的作用研究进展 [J]. *陕西医学杂志*, 2021, 50(3): 377-380.
WANG Min, LI Xiping, YANG Mei, et al. Research progress on Caspase signaling pathway and its role in treatment of breast cancer [J]. *Shaanxi Medical Journal*, 2021, 50(3): 377-380.

(编辑:相峰)