

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250269

· 论 著 ·

多杀性巴氏杆菌来源的外膜囊泡抑制膀胱癌细胞增殖、侵袭、迁移并促进凋亡

王 阳^{1△}, 王泽益^{1△}, 曹向乾², 沈 兵^{1,3*}

1. 南京医科大学附属上海一院临床医学院, 上海 200080

2. 上海交通大学附属上海市第一人民医院泌尿外科中心, 上海 200080

3. 同济大学附属第十人民医院泌尿外科, 上海 200072

〔摘要〕 **目的** 探究多杀性巴氏杆菌 (*Pm*) 培养上清液及 *Pm* 来源的外膜囊泡 (*Pm*-OMV) 对膀胱癌细胞的生物学作用。**方法** 培养 *Pm* 并收集其培养上清液, 以 PBS 和脑心浸出液 (BHI) 细菌培养基作为对照组, 通过 CCK-8、划痕实验、Transwell 迁移和侵袭实验检测其对膀胱癌细胞系 T24 和 5637 增殖、迁移和侵袭能力的影响。采用超速离心法收集 *Pm* 培养上清液中的 *Pm*-OMV, 以上清液剩余成分作为对照, 通过 CCK-8、Transwell 迁移和侵袭实验检测其对 T24 和 5637 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响, 通过流式细胞术检测其对 T24 和 5637 细胞凋亡的作用。最后在裸小鼠体内构建异种移植瘤模型, 瘤内多点注射 *Pm*-OMV 和 PBS, 观察肿瘤生长情况, 并通过增殖标志物 Ki67 免疫组织化学染色及 TUNEL 法检测验证 *Pm*-OMV 在体内对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响。**结果** 在体外实验中, *Pm* 培养上清液显示出对 T24 和 5637 细胞增殖、侵袭及迁移能力的抑制作用, 与 PBS 组和 BHI 组相比差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) ; *Pm*-OMV 不仅能够抑制 T24 和 5637 细胞的增殖、侵袭和迁移, 还能诱导细胞发生凋亡, 与上清液剩余成分对照组相比差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) 。裸小鼠皮下移植瘤实验进一步证实了 *Pm*-OMV 在体内对膀胱癌细胞增殖的抑制作用和促凋亡效果, 与 PBS 对照组相比差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) 。**结论** *Pm*-OMV 可抑制膀胱癌细胞增殖、侵袭、迁移并促进其凋亡, 为研究肿瘤内微生物调控肿瘤进展的机制和开发新的膀胱癌治疗策略提供了实验依据。

〔关键词〕 膀胱肿瘤; 多杀性巴氏杆菌; 细菌外膜囊泡; 细胞增殖; 细胞凋亡

〔引用本文〕 王阳, 王泽益, 曹向乾, 等. 多杀性巴氏杆菌来源的外膜囊泡抑制膀胱癌细胞增殖、侵袭、迁移并促进凋亡 [J]. 海军军医大学学报, 2025, 46 (8) : 1000-1008. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250269.

Outer membrane vesicles derived from *Pasteurella multocida* inhibit proliferation, invasion, and migration of bladder cancer cells and promote apoptosis

WANG Yang^{1△}, WANG Zeyi^{1△}, CAO Xiangqian², SHEN Bing^{1,3*}

1. Shanghai General Hospital of Nanjing Medical University, Shanghai 200080, China

2. Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

3. Department of Urology, Shanghai Tenth People's Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200072, China

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the biological effects of *Pasteurella multocida* (*Pm*) culture supernatant and *Pm*-derived outer membrane vesicle (OMV) on bladder cancer cells. **Methods** *Pm* was cultured and its supernatant was collected. The effects of the supernatant on proliferation, migration and invasion of bladder cancer cell lines (T24 and 5637) were assessed by cell counting kit 8 (CCK-8), wound healing assay, and Transwell migration and invasion assays with phosphate-buffered saline (PBS) and brain heart infusion (BHI) broth as controls. *Pm*-OMV were isolated from the supernatant via ultracentrifugation, and the remaining components of the supernatant served as control. The effects of *Pm*-OMV on proliferation, migration and invasion of T24 and 5637 cells were assessed by CCK-8 and Transwell migration and invasion assays. Apoptosis was analyzed by flow cytometry. A nude mouse xenograft tumor model was established. After intratumoral multi-point injections of *Pm*-OMV or PBS, the tumor growth was evaluated and the effects of *Pm*-OMV on proliferation and apoptosis of bladder cancer cells *in vivo* were verified by Ki67 (a proliferation marker) immunohistochemical staining and TUNEL assay. **Results** *Pm* culture supernatant significantly inhibited the proliferation, invasion, and migration of T24 and

〔收稿日期〕 2025-04-27

〔接受日期〕 2025-07-14

〔基金项目〕 国家自然科学基金 (82072821). Supported by National Natural Science Foundation of China (82072821).

〔作者简介〕 王 阳, 硕士生. E-mail: wy838982834@163.com; 王泽益, 硕士, 住院医师. E-mail: wangzy960930@163.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

*通信作者 (Corresponding author). E-mail: urodrshenbing@shsmu.edu.cn

5637 cells *in vitro* compared with PBS and BHI controls (all $P < 0.01$). *Pm*-OMV not only inhibited the proliferation, invasion, and migration of T24 and 5637 cells, but also induced the apoptosis, and the differences were significant compared with the remaining components of the supernatant (all $P < 0.05$). The nude mouse subcutaneous tumor transplantation experiment further confirmed that *Pm*-OMV inhibited the proliferation of bladder cancer cells and promoted apoptosis *in vivo*, and the differences were significant compared with the PBS control (all $P < 0.05$). **Conclusion** *Pm*-OMV can inhibit the proliferation, invasion, and migration of bladder cancer cells and promote the apoptosis. It provides an experimental basis for studying the mechanism of microbial regulation of tumor progression and for developing new treatment strategies for bladder cancer.

[**Key words**] bladder neoplasms; *Pasteurella multocida*; bacterial outer membrane vesicles; cell proliferation; apoptosis

[**Citation**] WANG Y, WANG Z, CAO X, et al. Outer membrane vesicles derived from *Pasteurella multocida* inhibit proliferation, invasion, and migration of bladder cancer cells and promote apoptosis[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(8): 1000-1008. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250269.

膀胱癌作为全球十大恶性肿瘤之一,在泌尿系统肿瘤中的发病率位居首位,5年死亡率高达30%,严重威胁人类健康^[1]。膀胱癌的发生、发展与多种危险因素相关,包括烟草暴露、遗传易感性、职业性致癌物(如芳香胺类化学品)接触、饮用水污染和血吸虫病等^[2]。近年来的流行病学调查发现全球女性吸烟率显著上升,然而女性膀胱癌发病率并未呈现同步增长^[3],这提示除了已知危险因素外,可能还存在其他因素参与了膀胱癌的发生和发展。人类微生物组由栖息在人体各部位的数万亿微生物构成,这些微生物与宿主形成了复杂的共生关系,在维持生理稳态和疾病发生、发展中发挥着关键作用^[4-5]。近年来,尿液微生物组在泌尿系统肿瘤中的作用逐渐受到研究者的重视,多项研究证实尿路中存在着丰富的微生物群落^[6-9],但关于这些微生物的来源及其在尿路中的定植特征等仍未完全阐明^[10]。有研究表明,肿瘤相关微生物群可能通过调节肿瘤微环境中的局部免疫反应来影响免疫治疗效果,进而调控肿瘤的进展^[11]。多项研究表明,在膀胱癌组织中可以检测到显著富集的巴氏杆菌属细菌^[12-13]。特别值得注意的是,在猪中观察到多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, *Pm*)感染可诱导膀胱上皮异常增生^[14],这提示该细菌可能具有直接的促癌作用。从分子机制来看,*Pm*分泌的分子量为146 000的多杀性巴氏杆菌蛋白毒素(*Pasteurella multocida* toxin, PMT)因其强效的促有丝分裂活性而被认为具有潜在的致癌特性,它能够持续激活宿主细胞内多个促增殖信号通路,这些通路的异常活化与肿瘤发生密切相关^[15]。这些发现提示*Pm*与膀胱癌的发生和发展可能存在直接关系。

外膜囊泡(outer membrane vesicle, OMV)是一种双层脂质结构的球形纳米级颗粒,存在于所有生物中。细菌OMV包含脂多糖、肽聚糖、蛋白质、核酸和细菌毒素等多种物质^[16-17],OMV可以与细胞及其周围环境进行通讯^[18],是细菌与外界环境交流的重要媒介。肿瘤中的OMV通过多种方式促进肿瘤的发生和发展。例如,幽门螺杆菌产生的OMV已被证明可以通过Toll样受体4激活NF- κ B信号通路,进而诱导胃上皮细胞分泌IL-8,为癌症的发展奠定基础^[19];来源于大肠埃希菌的OMV对宿主细胞具有基因毒性作用,提示其具有潜在的致癌特性^[20]。本研究拟探讨*Pm*来源的OMV(*Pm*-OMV)在膀胱癌发病机制中的作用,进一步拓展微生物来源OMV在肿瘤发生和进展中的研究,同时为开发更有效的精准治疗策略提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌种、细胞及实验动物 *Pm*从美国标准生物制品收藏中心(ATCC43137)获得,以脑心浸出液(brain heart infusion, BHI)细菌培养基培养,该*Pm*菌株不分泌PMT,没有PMT的强促有丝分裂活性。膀胱癌细胞株T24及5637均购自中国科学院上海细胞生物研究所,以完全培养基(含有10% FBS、1%青霉素-链霉素-两性霉素B混合液的RPMI 1640培养基)进行培养,培养环境为5% CO₂、37℃。6周龄的健康雌性BALB/c裸小鼠购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2024-0001],饲养于同济大学附属第十人民医院科创中心动物中心SPF级动物房[实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2021-0012]中,维持恒定温度(约20℃)和

相对湿度(约45%)、12 h光照/12 h黑暗的昼夜节律(7:00-19:00为光照期),小鼠可自由摄取高温灭菌处理的标准颗粒饲料和无菌饮水。本研究通过南京医科大学附属上海市第一人民医院实验动物伦理委员会审批(2021KY046)。

1.2 主要实验试剂 RPMI 1640培养基购于上海源培生物科技股份有限公司;细胞冻存液、胰蛋白酶消化液、青霉素-链霉素-两性霉素B(100×)均购自苏州新赛美生物科技有限公司;CCK-8检测试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;膜联蛋白V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、多聚甲醛、结晶紫、3,3'-双十八烷氧基羰花青高氯酸盐(3,3'-di-octadecyloxacarbocyanine perchlorate, DiO)、PI染色液和TUNEL试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;BCA蛋白测定试剂盒购于上海雅酶生物医药科技有限公司;Transwell小室及基质胶购于美国Corning公司;DAB显色试剂盒购于福州迈新生物技术开发有限公司;免疫组织化学染色所用Ki67抗体购于英国Abcam公司。

1.3 *Pm*培养上清液及*Pm*-OMV的获取 将*Pm*在BHI细菌培养基中培养24 h,培养环境为5% CO₂、37℃。通过测量600 nm波长处的光密度值(D_{600})监测细菌生长状态,当 D_{600} 达到0.5时收获培养物。通过梯度超速离心法获得无菌的培养上清液及*Pm*-OMV。用BCA蛋白测定试剂盒测定获得的*Pm*-OMV的蛋白浓度,并将其储存在-80℃备用。

1.3.1 *Pm*-OMV的形态观察 采用碳膜铜网固定样品,使碳膜面朝上置于滤纸上。取新鲜*Pm*-OMV悬液滴加于铜网表面,静置吸附后用滤纸吸除残留液体。随后进行负染处理,分2次滴加乙酸双氧铀染液,每次作用后吸干。用超纯水冲洗以去除多余染料,晾干过夜后在透射电子显微镜下观察。

1.3.2 *Pm*-OMV体外细胞摄取实验 首先将浓度为10 μmol/L的DiO染料加到一定量的*Pm*-OMV悬液中,避光孵育30 min。随后进行超速离心(4℃, 110 000×*g*, 30 min)以洗去未与*Pm*-OMV结合的染料,弃去上清,收集沉淀得到DiO标记的*Pm*-OMV。将细胞密度为 5×10^5 的T24细胞接种于直径为35 mm的共聚焦培养皿中,待细胞贴壁后加入不同浓度DiO染料标记的*Pm*-OMV与T24细胞在细胞培养箱中共孵育6 h。然后弃去上清,PBS洗涤3次;用4%多聚甲醛溶液固定细胞20 min,PBS洗涤

3次;加入DAPI核染料对细胞核进行复染,避光孵育30 min,PBS洗涤3次。在共聚焦显微镜下观察。

1.4 膀胱癌细胞体外实验

1.4.1 细胞分组及处理 (1)将膀胱癌细胞系T24、5637分为对照组、培养上清组、BHI组,分别加入PBS、*Pm*培养上清液、BHI细菌培养基过夜培养,收集细胞进行后续检测。(2)将膀胱癌细胞系T24、5637分为对照组、*Pm*-OMV组,分别加入1.3节获得的无菌培养上清液和*Pm*-OMV过夜培养,收集细胞进行后续检测。

1.4.2 CCK-8细胞增殖实验 采用标准CCK-8法检测细胞增殖活性。在96孔板中每孔接种100 μL细胞悬液(2 000个细胞/孔),外围孔加入无菌PBS作为保湿对照。将培养板置于培养箱中培养,每组设置3个复孔以确保数据可靠性。从接种次日开始每日定时进行CCK-8检测。首先配制新鲜检测工作液(RPMI 1640基础培养基与CCK-8试剂按9:1比例混合)。检测时弃去孔内原培养基,用PBS洗涤后每孔加入100 μL检测工作液,37℃避光孵育2 h。使用酶标仪于450 nm波长处测定各孔光密度值(D_{450}),连续监测4 d并记录数据,绘制细胞生长曲线。

1.4.3 集落形成实验 取处理后的细胞以2 000/孔的密度接种至6孔板中,用完全培养基培养2周,每3 d更换一次完全培养基以保证营养充分。2周后,于显微镜下观察细胞集落内的细胞数量,当大多数细胞集落内有50~100个细胞时终止培养。吸去培养基并洗涤后,加入4%多聚甲醛溶液固定细胞15 min。弃去固定液,用PBS洗涤3次,加入结晶紫染色液染色30 min。弃去染色液,用PBS洗涤3次。用光镜拍照后进行统计分析。

1.4.4 划痕实验 首先在无菌6孔板底部外表面用防水记号笔标记3条间距8 mm的平行定位线,经紫外线消毒30 min后备用。取对数生长期细胞制备单细胞悬液,每孔接种2 mL悬液,置于培养箱中培养24~48 h至细胞形成致密单层。吸弃培养基后用PBS洗涤去除脱落细胞。采用200 μL黄色枪头沿垂直于标记线的方向划出3道平行划痕,划痕间距保持均匀。再次用PBS洗涤去除游离细胞后,更换为无血清维持培养基(含1%青霉素-链霉素-两性霉素B的RPMI 1640培养基)。将培养板置于培养箱中,分别在0 h和24 h采集划痕区

域图像。使用ImageJ软件测量划痕面积,计算细胞迁移率[迁移率(%)=(0 h划痕面积-24 h划痕面积)/0 h划痕面积×100%]。

1.4.5 Transwell 迁移和侵袭实验 (1) 迁移实验:调整细胞密度至 $2\times 10^5/\text{mL}$ 。在24孔板下室加入600 μL 含10% FBS的完全培养基作为趋化剂,上室接种150 μL 细胞悬液,置于培养箱中培养12~48 h;取出Transwell小室,用湿润棉签拭去上室未迁移细胞。用4%多聚甲醛溶液固定15 min,结晶紫染色20 min, PBS漂洗后晾干。于显微镜下随机选取5个视野拍照,使用ImageJ软件计数迁移细胞。(2) 侵袭实验:将基质胶置于冰上融化,用预冷枪头以50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 均匀涂布于Transwell上室膜表面,37℃凝胶化1 h。后续细胞接种及处理流程同迁移实验。

1.4.6 细胞凋亡检测 待处理细胞达培养皿80%~90%密度时,收集培养上清液至标记离心管,用PBS洗涤培养皿2次并收集洗涤液。采用不含EDTA的胰酶(0.25%胰蛋白酶)消化贴壁细胞,加入含血清培养基终止消化,将细胞悬液与先前收集的上清液和洗涤液合并,离心后弃上清。用PBS重悬细胞并再次离心洗涤,再用PBS调整细胞密度至 $1\times 10^6/\text{mL}$ 。实验设置空白对照(未染色细胞)、单染对照(膜联蛋白V-FITC或PI单独染色)及实验组。取 1×10^5 个细胞,离心后弃上清,加入膜联蛋白V结合缓冲液重悬,依次加入膜联蛋白V-FITC和PI染液,混匀后室温避光孵育15 min。染色完成后立即置于冰上,1 h内进行流式细胞术检测。采用FlowJo软件分析数据,通过FITC⁺/PI⁻和FITC⁺/PI⁺细胞比例评估细胞凋亡水平。

1.5 裸小鼠移植瘤实验

1.5.1 动物分组及处理 将6周龄雌性BALB/c裸小鼠随机分为对照组(PBS)、实验组(*Pm*-OMV),每组6只。将T24细胞(7×10^6 个)经皮下注射到小鼠背部区域诱导皮下肿瘤形成,然后每3 d在肿瘤部位多点注射1次PBS或*Pm*-OMV。连续观察小鼠皮下肿瘤的生长情况,每2 d测量1次肿瘤尺寸,计算肿瘤体积(肿瘤体积= $0.5\times \text{长度}\times \text{宽度}^2$)。30 d后将小鼠安乐死,切取皮下肿瘤进行后续分析。

1.5.2 免疫组织化学染色 取新鲜肿瘤组织样本用4%多聚甲醛溶液固定。脱水、透明、浸蜡后包埋,切成4~6 μm 厚的切片。将切片置于60℃烘

箱中烘烤30 min脱蜡。依次用二甲苯、梯度乙醇处理,直至水化。采用热修复暴露抗原表位。用3% H_2O_2 处理10~15 min,阻断内源性过氧化物酶活性。用5%牛血清白蛋白溶液或正常血清封闭非特异性结合位点,室温孵育30 min。滴加稀释的Ki67抗体,4℃孵育过夜或室温孵育1~2 h。滴加HRP标记的二抗,室温孵育30~60 min。使用DAB显色剂显色,在显微镜下观察以控制显色时间。用苏木精复染细胞核,脱水、透明后封片。于显微镜下随机选取视野拍摄。

1.5.3 TUNEL 实验 取肿瘤组织切片,用蛋白酶K处理15~30 min增加细胞膜通透性。按试剂盒说明配制TUNEL反应混合液(含TdT酶和荧光标记的dUTP)。滴加混合液于切片上,37℃湿盒中孵育1 h。用PBS洗涤切片3次,每次5 min。用DAPI染色5 min, PBS洗涤。用苏木精复染细胞核,脱水透明后封片。于显微镜下随机选取视野拍摄。利用ImageJ软件计算不同通道下的灰度值,计算凋亡指数,凋亡指数(%)=TUNEL通道灰度值/DAPI通道灰度值×100%。

1.6 统计学处理 使用GraphPad Prism 9.3.0软件进行统计学分析。所有实验均独立重复3次。经正态性和方差齐性检验后,计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用Student's *t*检验;多组间比较采用单因素方差分析,事后多重比较使用Tukey法;连续监测数据的比较采用双因素重复测量方差分析。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 *Pm* 培养上清液在体外抑制膀胱癌细胞的增殖、侵袭和迁移 用*Pm*培养上清液处理人膀胱癌细胞系5637和T24并设立BHI细菌培养基和PBS处理作为对照。在增殖能力方面,CCK-8实验和集落形成实验结果(图1A、1B)显示,*Pm*培养上清液抑制了膀胱癌细胞的增殖能力,与BHI组和PBS组相比差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);在CCK-8实验中,BHI细菌培养基表现出部分促增殖作用(与PBS组相比, $P<0.01$),这可能与含有PBS中缺乏的特定营养物质有关。在侵袭能力方面,Transwell侵袭实验(图1C、1D)证实*Pm*培养上清液能有效抑制膀胱癌细胞的侵袭能力,与BHI组和PBS组相比差异均有统计学意义(均 $P<$

0.01), 而 BHI 细胞培养基处理表现出促侵袭作用 (与 PBS 组相比, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在迁移能力方面, Transwell 迁移实验 (图 1E、1F) 和划痕实验 (图 1G、1H) 一致表明, *Pm* 培养上清液处

理降低了膀胱癌细胞的迁移能力, 与 BHI 组和 PBS 组相比差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。这些结果证明 *Pm* 培养上清液具有多重抑癌效应, 能同时抑制膀胱癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

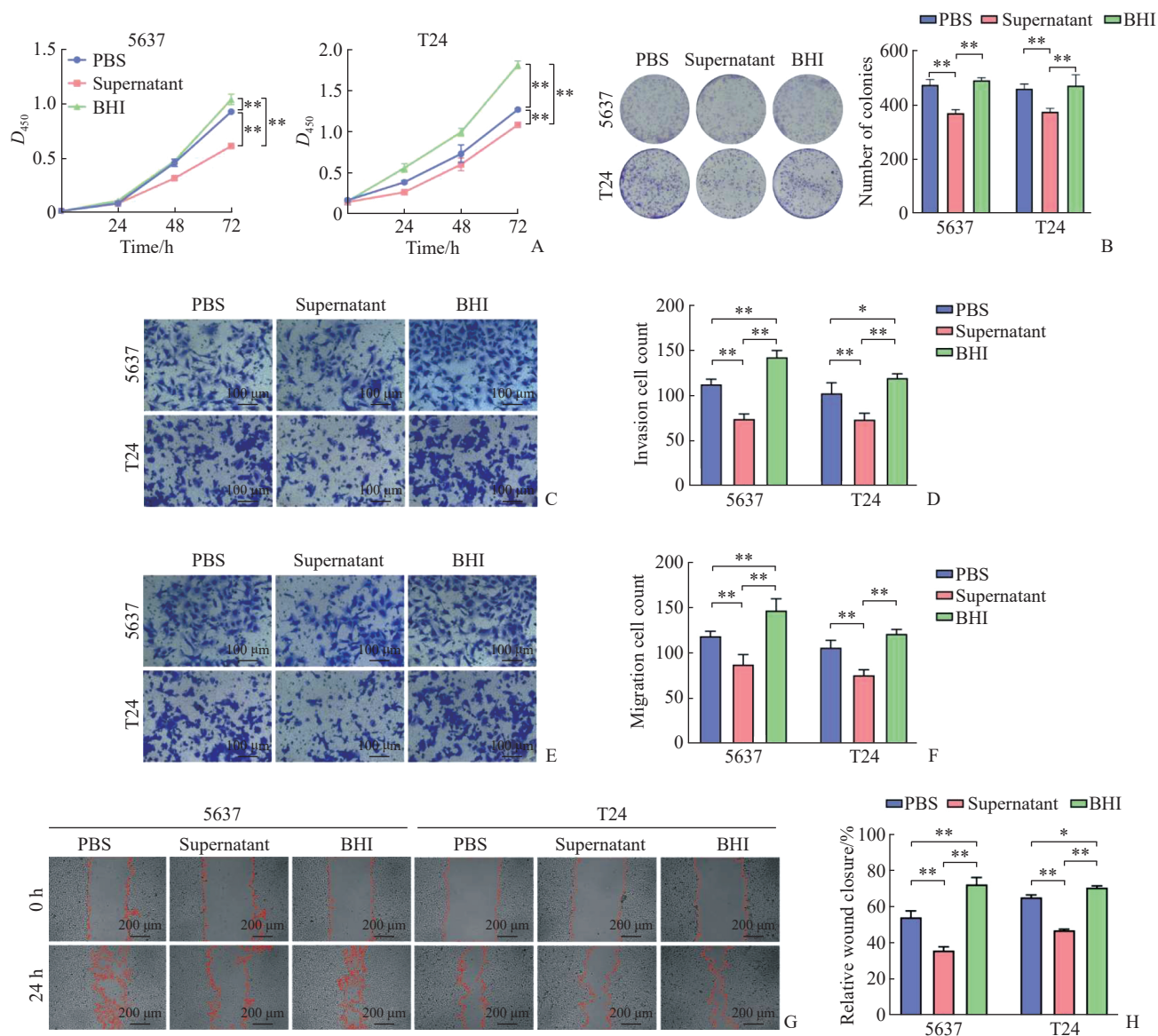


图 1 *Pm* 培养上清液对膀胱癌细胞系 5637 和 T24 的体外作用

Fig 1 Effects of *Pm* supernatant on bladder cancer cell lines 5637 and T24 in vitro

A: Cell proliferation activity assessed by cell counting kit-8; B: Colony formation assay results; C, D: Transwell invasion assay results; E, F: Transwell migration assay results; G, H: Cell migration assessed by wound healing assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *Pm*: *Pasteurella multocida*; PBS: Phosphate-buffered saline; BHI: Brain heart infusion.

2.2 *Pm*-OMV 在体外抑制膀胱癌细胞的增殖、侵袭和迁移并促进凋亡 基于上述结果中 *Pm* 培养上清液的抑癌效应, 推测 OMV 可能是其中的关键活性成分。采用超速离心法从培养 *Pm* 上清液中分离纯化 *Pm*-OMV, 透射电子显微镜观察结果 (图 2A) 显示, *Pm*-OMV 呈现典型的圆形囊泡结构, 部分样

本显示塌陷特征, 平均直径约 110 nm, 与已知的革兰氏阴性菌 OMV 特征相符。采用 DiO 荧光标记技术追踪 *Pm*-OMV 在膀胱癌细胞 T24 内的摄取过程, 共聚焦显微镜观察结果 (图 2B) 显示, T24 细胞能有效内化 *Pm*-OMV, 这为后续功能研究提供了细胞学基础。

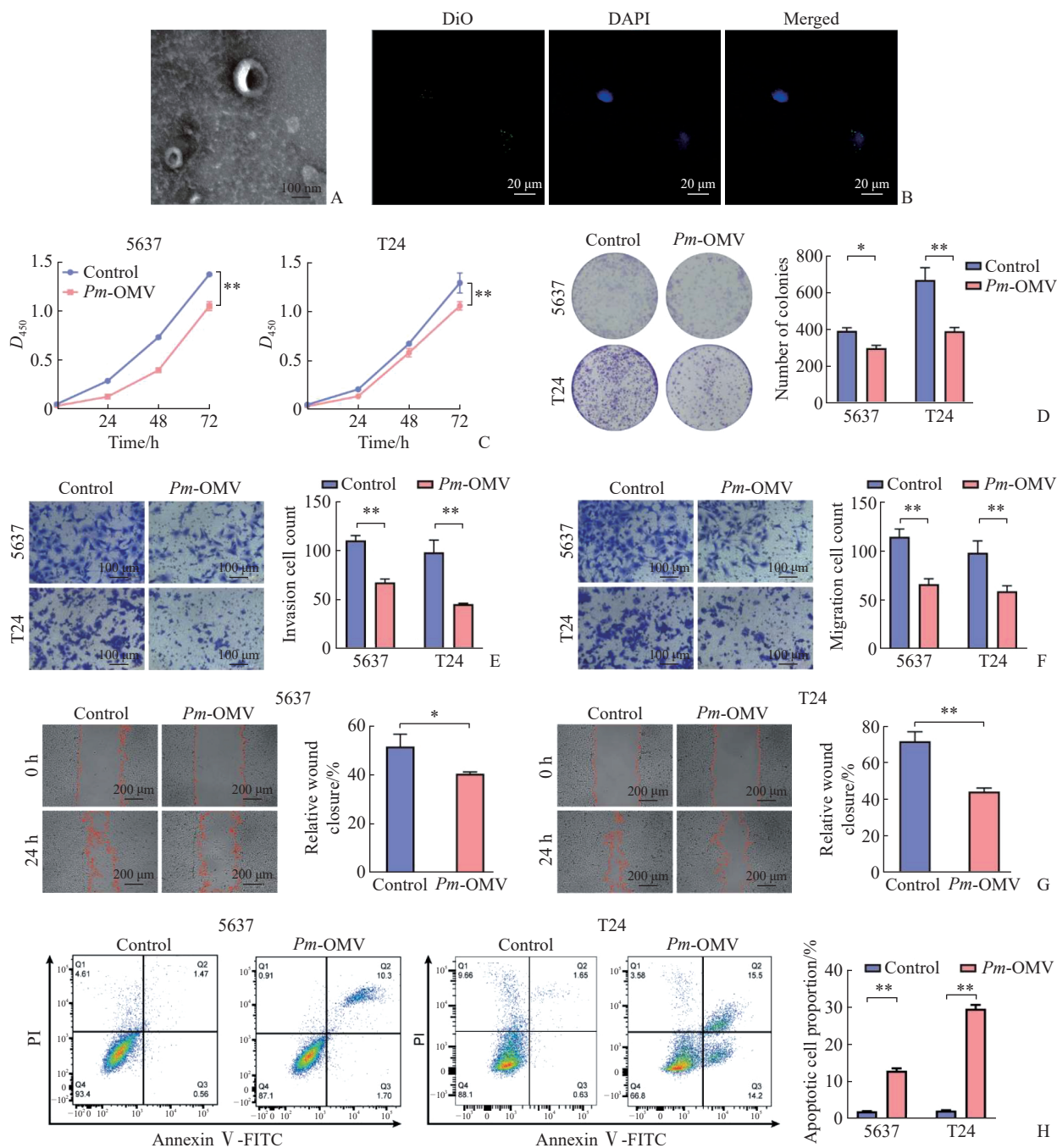


图 2 *Pm*-OMV 对膀胱癌细胞系 5637 和 T24 的体外作用

Fig 2 Effects of *Pm*-OMV on bladder cancer cell lines 5637 and T24 *in vitro*

A: The transmission electron microscopical imaging of *Pm*-OMV; B: Confocal images of the interaction between *Pm*-OMV and T24 cells; C: The cell proliferation activity detected by cell counting kit-8; D: Colony formation assay results; E, F: The invasion (E) and migration (F) abilities of cells assessed by Transwell assay; G: The migration ability assessed by wound healing assay; H: Cell apoptosis detected by flow cytometry. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *Pm*: *Pasteurella multocida*; OMV: Outer membrane vesicle; DiO: 3,3'-di-octadecyloxycarbocyanine perchlorate; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; PI: Propidium iodide; FITC: Fluorescein isothiocyanate.

设置上清液剩余成分作为对照, 评估 *Pm*-OMV 对膀胱癌细胞的多重抑制作用。在增殖能力方面, CCK-8 和集落形成实验结果 (图 2C、2D) 显示, *Pm*-OMV 能抑制 T24 和 5637 细胞的增殖能

力, 与上清液剩余成分对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ; 在侵袭能力方面, Transwell 侵袭实验 (图 2E) 证实 *Pm*-OMV 能有效抑制膀胱癌细胞的侵袭能力, 与上清液剩余成分

对照组相比差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);在迁移能力方面,Transwell迁移实验及划痕实验(图2F、2G)均显示 *Pm*-OMV 可有效降低癌细胞的迁移能力,与上清液剩余成分对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);在促凋亡作用方面,流式细胞术检测结果(图2H)显示, *Pm*-OMV 提高了膀胱癌细胞的凋亡率,与上清液剩余成分对照组相比差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。这些结果证实 *Pm*-OMV 既能够抑制膀胱癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力,又可以促进细胞凋亡,表明 *Pm*-OMV 可通过多重机制抑制膀胱癌细胞的恶性表型。

2.3 *Pm*-OMV 在体内抑制膀胱癌细胞的增殖并促进细胞凋亡 建立 T24 细胞异种移植瘤裸小鼠模型,分别在肿瘤内多点注射 *Pm*-OMV 和 PBS (对

照)。实验结果显示, *Pm*-OMV 处理抑制了肿瘤生长, *Pm*-OMV 组肿瘤体积增长减缓,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$,图3A);终末取材时 *Pm*-OMV 组肿瘤大小小于对照组(图3B),平均肿瘤重量低于对照组($P<0.01$,图3C)。免疫组织化学染色结果(图3D)显示, *Pm*-OMV 组肿瘤组织中增殖标志物 Ki67 表达水平下调,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),提示 *Pm*-OMV 具有在体内抑制肿瘤细胞增殖的作用。此外, TUNEL 法检测结果(图3E)显示, *Pm*-OMV 组肿瘤组织的凋亡指数增加,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),这与体外实验中观察到的促凋亡效应一致。这些结果从多个角度证实了 *Pm*-OMV 在体内环境中表现出显著的抗肿瘤活性,其作用机制可能涉及抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡双重途径。

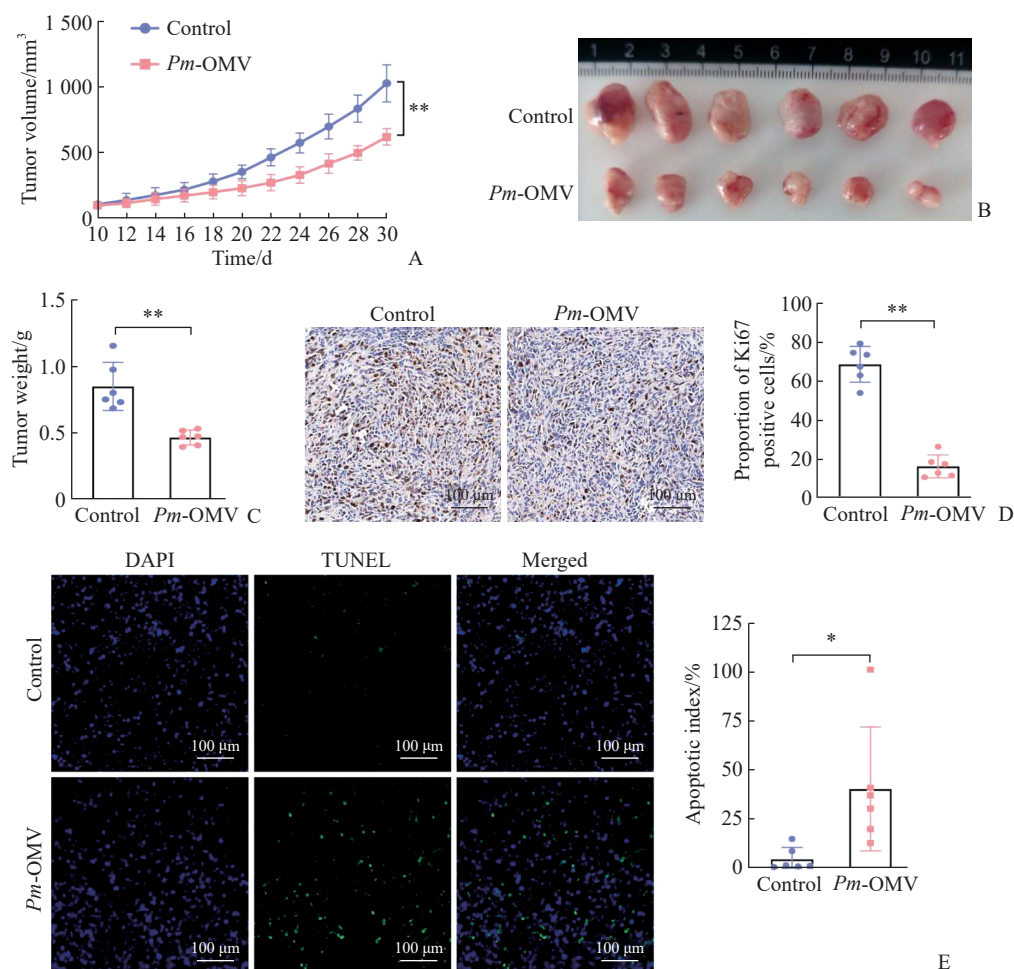


图3 *Pm*-OMV 对裸小鼠膀胱癌异体移植瘤的影响

Fig 3 Effects of *Pm*-OMV on bladder cancer xenografts in nude mice

A: Tumor growth curves of xenograft tumors; B: Pictures of surgically resected xenograft tumors; C: Tumor weight analysis result; D: Immunohistochemistry staining of Ki67 in the xenograft tumors; E: The apoptosis of the xenograft tumor cells detected by TUNEL assay. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. $n=6$, $\bar{x}\pm s$. *Pm*: *Pasteurella multocida*; OMV: Outer membrane vesicle; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

3 讨 论

人体中蕴藏着丰富的微生物,研究表明肿瘤中也存在多样化的微生物群落^[21]。在正常组织中,由于免疫系统的监视和清除,微生物的丰度相对较低。然而,肿瘤组织中的微生物可以利用肿瘤细胞的免疫逃逸特性大量增殖,特别是在实体肿瘤的中心坏死区域微生物的丰度远远大于周围正常组织^[22]。肿瘤内的微生物群落受到肿瘤的保护,在一定程度上可以影响肿瘤的进展^[23]。膀胱癌是男性泌尿生殖系统肿瘤中最常见的恶性肿瘤^[24]。传统意义上认为泌尿系统属于无菌环境,然而近年来多项研究证实尿路中存在着丰富的微生物群落^[6-9],在膀胱癌组织中可以检测到显著富集的巴氏杆菌属细菌^[12-13]。*Pm* 是一种致病性革兰氏阴性杆菌,动物实验发现该细菌可能具有直接的促癌作用^[14]。膀胱肿瘤内微生物可通过调节肿瘤微环境中浸润的免疫细胞来杀伤肿瘤,影响患者预后,通过靶向肿瘤内的微生物重塑肿瘤免疫微环境是增强抗肿瘤免疫反应的一种有前景的策略。

本研究通过体外实验证实,失去 PMT 分泌能力的 *Pm* 的培养上清液可抑制膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移能力,表现出显著的抗肿瘤活性。该现象提示, *Pm* 分泌至培养上清液中的某些组分可能具备抑制肿瘤细胞恶性行为的功能。首先, *Pm* 在培养过程中会释放 OMV, OMV 富含脂多糖、外膜蛋白及多种功能性分泌酶,已被证实具有诱导肿瘤细胞凋亡、抑制增殖的作用^[25]。因此,即使未进行囊泡纯化,培养上清液中富含的 OMV 亦可能是主要的抗肿瘤活性成分之一。其次,尽管本研究使用的 *Pm* 菌株不分泌已知的促有丝分裂毒素 PMT,但仍可能分泌其他生物活性分子或非毒素性胞外酶,如蛋白酶、磷脂酶等,这些因子可破坏肿瘤细胞结构、诱导细胞应激或凋亡^[26]。*Pm* 培养上清液的抗肿瘤活性主要可能来源于 OMV 及其伴随分泌的细胞外组分,本研究仅讨论了 OMV 的抗肿瘤作用,其他细胞外组分仍需进一步研究。

近年来, OMV 在肿瘤发生和发展过程中的通信和调控作用引起了越来越多的关注,因为它们被认为是细菌与宿主细胞之间通信的重要介质^[27]。此外,研究发现 OMV 更容易在肿瘤微环境中积累^[28]。OMV 可作为一种简单制备的天然来源的纳米颗粒

材料,已被证明在癌症治疗药物递送中发挥重要作用;此外,与合成的纳米颗粒相比,这些细菌分泌物来源的载体具有更好的生物组织相容性^[29]。OMV 具有靶向递送包裹药物到肿瘤组织的能力,有助于改善药物的药代动力学性质和降低药物的毒性作用,可作为一种安全、有效的递送肿瘤药物的载体。Kuerban 等^[28]对肺炎克雷伯菌来源的 OMV 进行研究并制备了负载多柔比星的 OMV,通过该 OMV 可以有效地将多柔比星递送到非小细胞肺癌细胞系 A549 中,并在小鼠模型中抑制肿瘤生长;OMV 还可以招募巨噬细胞到肿瘤微环境,增强多柔比星在体内的细胞毒性。这种新颖的思路可以在递送化疗药物的同时降低脱靶毒性,触发合适的免疫反应,抑制癌症进展。本研究通过体外实验和裸小鼠异体移植瘤实验证实了 *Pm*-OMV 对膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移具有抑制作用,同时基于文献报道的革兰氏阴性菌 OMV 促凋亡作用^[30],观察到 *Pm*-OMV 对膀胱癌细胞具有促凋亡作用,从多个角度证实了 *Pm*-OMV 在体内外环境中表现出显著的抗肿瘤活性,其作用机制可能涉及抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡双重途径。

综上所述,本研究通过体外和体内实验揭示了 *Pm*-OMV 能够在体内外抑制膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移,并诱导膀胱癌细胞发生凋亡。这一结果不仅拓展了肿瘤内微生物与肿瘤之间相互作用的认知,还证明 *Pm*-OMV 成为具有抑制膀胱癌作用的纳米载体的可能性,为纳米医学联合药物治疗膀胱肿瘤研究提供了思路。然而,关于 *Pm* 及其 OMV 在肿瘤微环境中的作用机制尚未得到充分阐明,仍需进一步明确其对肿瘤内免疫的调节作用。

[参 考 文 献]

- [1] RICHTERS A, ABEN K K H, KIEMENEY L A L M. The global burden of urinary bladder cancer: an update[J]. World J Urol, 2020, 38(8): 1895-1904. DOI: 10.1007/s00345-019-02984-4.
- [2] DY G W, GORE J L, FOROUZANFAR M H, et al. Global burden of urologic cancers, 1990-2013[J]. Eur Urol, 2017, 71(3): 437-446. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.10.008.
- [3] GRAM I T, SANDIN S, BRAATEN T, et al. The hazards of death by smoking in middle-aged women[J]. Eur J Epidemiol, 2013, 28(10): 799-806. DOI: 10.1007/s10654-013-9851-6.
- [4] GILBERT J A, BLASER M J, GREGORY CAPORASO J,

- et al. Current understanding of the human microbiome[J]. Nat Med, 2018, 24(4): 392-400. DOI: 10.1038/nm.4517.
- [5] HOU K, WU Z X, CHEN X Y, et al. Microbiota in health and diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 135. DOI: 10.1038/s41392-022-00974-4.
- [6] NELSON D E, DONG Q, VAN DER POL B, et al. Bacterial communities of the coronal sulcus and distal urethra of adolescent males[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36298. DOI: 10.1371/journal.pone.0036298.
- [7] FOUTS D E, PIEPER R, SZPAKOWSKI S, et al. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury[J]. J Transl Med, 2012, 10: 174. DOI: 10.1186/1479-5876-10-174.
- [8] WOLFE A J, BRUBAKER L. "Sterile urine" and the presence of bacteria[J]. Eur Urol, 2015, 68(2): 173-174. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.02.041.
- [9] HILT E E, MCKINLEY K, PEARCE M M, et al. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(3): 871-876. DOI: 10.1128/JCM.02876-13.
- [10] MARKOWSKI M C, BOORJIAN S A, BURTON J P, et al. The microbiome and genitourinary cancer: a collaborative review[J]. Eur Urol, 2019, 75(4): 637-646. DOI: 10.1016/j.eururo.2018.12.043.
- [11] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21590.
- [12] PEDERZOLI F, FERRARESE R, AMATO V, et al. Sex-specific alterations in the urinary and tissue microbiome in therapy-naïve urothelial bladder cancer patients[J]. Eur Urol Oncol, 2020, 3(6): 784-788. DOI: 10.1016/j.euo.2020.04.002.
- [13] YAO R, AI B, WANG Z, et al. Uncovering microbial composition of the tissue microenvironment in bladder cancer using RNA sequencing data[J]. J Cancer, 2024, 15(8): 2431-2441. DOI: 10.7150/jca.93055.
- [14] HOSKINS I C, THOMAS L H, LAX A J. Nasal infection with *Pasteurella multocida* causes proliferation of bladder epithelium in gnotobiotic pigs[J]. Vet Rec, 1997, 140(1): 22. DOI: 10.1136/vr.140.1.22.
- [15] PREUSS I, HILDEBRAND D, ORTH J H C, et al. *Pasteurella multocida* toxin is a potent activator of anti-apoptotic signalling pathways[J]. Cell Microbiol, 2010, 12(8): 1174-1185. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01462.x.
- [16] JAHROMI L P, FUHRMANN G. Bacterial extracellular vesicles: understanding biology promotes applications as nanopharmaceuticals[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 173: 125-140. DOI: 10.1016/j.addr.2021.03.012.
- [17] LIANG X, DAI N, SHENG K, et al. Gut bacterial extracellular vesicles: important players in regulating intestinal microenvironment[J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2134689. DOI: 10.1080/19490976.2022.2134689.
- [18] BOMBERGER J M, MACEACHRAN D P, COUTERMARSH B A, et al. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(4): e1000382. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000382.
- [19] CHOI M S, ZE E Y, PARK J Y, et al. *Helicobacter pylori*-derived outer membrane vesicles stimulate interleukin 8 secretion through nuclear factor kappa B activation[J]. Korean J Intern Med, 2021, 36(4): 854-867. DOI: 10.3904/kjim.2019.432.
- [20] TYRER P C, FRIZELLE F A, KEENAN J I. *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles are genotoxic to human enterocyte-like cells[J]. Infect Agent Cancer, 2014, 9(1): 2. DOI: 10.1186/1750-9378-9-2.
- [21] SEPICH-POORE G D, ZITVOGEL L, STRAUSSMAN R, et al. The microbiome and human cancer[J]. Science, 2021, 371(6536): eabc4552. DOI: 10.1126/science.abc4552.
- [22] MCALLISTER F, KHAN M A W, HELMINK B, et al. The tumor microbiome in pancreatic cancer: bacteria and beyond[J]. Cancer Cell, 2019, 36(6): 577-579. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.11.004.
- [23] FU A, YAO B, DONG T, et al. Tumor-resident intracellular microbiota promotes metastatic colonization in breast cancer[J]. Cell, 2022, 185(8): 1356-1372.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2022.02.027.
- [24] JUBBER I, ONG S, BUKAVINA L, et al. Epidemiology of bladder cancer in 2023: a systematic review of risk factors[J]. Eur Urol, 2023, 84(2): 176-190. DOI: 10.1016/j.eururo.2023.03.029.
- [25] KIM O Y, PARK H T, DINH N T H, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 626. DOI: 10.1038/s41467-017-00729-8.
- [26] CHOI D S, KIM D K, CHOI S J, et al. Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proteomics, 2011, 11(16): 3424-3429. DOI: 10.1002/pmic.201000212.
- [27] SARTORIO M G, PARDUE E J, FELDMAN M F, et al. Bacterial outer membrane vesicles: from discovery to applications[J]. Annu Rev Microbiol, 2021, 75: 609-630. DOI: 10.1146/annurev-micro-052821-031444.
- [28] KUERBAN K, GAO X, ZHANG H, et al. Doxorubicin-loaded bacterial outer-membrane vesicles exert enhanced anti-tumor efficacy in non-small-cell lung cancer[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(8): 1534-1548. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.02.002.
- [29] FANG R H, KROLL A V, GAO W, et al. Cell membrane coating nanotechnology[J]. Adv Mater, 2018, 30(23): e1706759. DOI: 10.1002/adma.201706759.
- [30] DEO P, CHOW S H, HAN M L, et al. Mitochondrial dysfunction caused by outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria activates intrinsic apoptosis and inflammation[J]. Nat Microbiol, 2020, 5(11): 1418-1427. DOI: 10.1038/s41564-020-0773-2.